

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**TITLE OF THE INVENTION****THE VACCINE AGAINST WEST NILE VIRUS****RELATED APPLICATIONS/PATENTS & INCORPORATION BY REFERENCE**

Reference is made herein to French Patent Application Serial No. \_\_\_\_\_, filed on \_\_\_\_\_.

Each of the applications and patents cited in this text, as well as each document or reference cited in each of the applications and patents (including during the prosecution of each issued patent; "application cited documents"), and each of the PCT and foreign applications or patents corresponding to and/or claiming priority from any of these applications and patents, and each of the documents cited or referenced in each of the application cited documents, are hereby expressly incorporated herein by reference. More generally, documents or references are cited in this text, either in a Reference List before the claims, or in the text itself; and, each of these documents or references ("herein-cited references"), as well as each document or reference cited in each of the herein-cited references (including any manufacturer's specifications, instructions, etc.), is hereby expressly incorporated herein by reference.

**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to immunogenic compositions that are useful for inducing an immunogenic response in a subject. The present invention further relates to administration of the immunogenic compositions to wild animals, to induce in the animals an immunogenic response that is protective against West Nile virus. The present invention further relates to oral administration of the immunogenic compositions to the wild animals. Oral administration, such in bait, comprises an efficient means of immunization in the wild. Following oral administration, the health of the wild animals is improved and overall incidence of the infection in the population is decreased, or eradicated. Wild animals receiving immunization can advantageously transfer neutralizing antibodies from their blood into a mosquito carrier, eradicating infectious virus from the carrier. Thus, immunization of wild animals can decrease transmission of the disease. Other aspects of the invention are described in or are obvious from the following disclosure (and within the ambit of the invention).

Wild and domestic birds are a reservoir for the West Nile virus and a propagation vector as a result of their migrations.

The virions of the West Nile fever virus are spherical particles with a diameter of 50 nm constituted by a lipoprotein envelope surrounding an icosahedric nucleocapsid containing a positive polarity, single-strand RNA.

A single open reading frame (ORF) encodes all the viral proteins in the form of a polyprotein. The cleaving and maturation of this polyprotein leads to the production of about ten different viral proteins. The structural proteins are encoded by the 5' part of the genome and correspond to the nucleocapsid designated C (14 kDa), the envelope glycoprotein designated E (50 kDa), the pre-membrane protein designated prM (23 kDa), the membrane protein designated M (7 kDa). The non-structural proteins are encoded by the 3' part of the genome and correspond to the proteins NS1 (40 kDa), NS2A (19 kDa), NS2B (14 kDa), NS3 (74 kDa), NS4A (15 kDa), NS4B (29 kDa), NS5 (97 kDa).

Partsh C. R. et al. (J. Gen. Virol., 1991, 72, 1645-1653), Kulkarni A. B. et al. (J. Virol., 1992, 66 (8), 3583-3592) and Hill A. B. et al. (J. Gen. Virol., 1992, 73, 1115-1123), on the basis of the vaccinia virus, constructed *in vivo* expression vectors containing various inserts corresponding to nucleotide sequences coding for non-structural proteins of the Kunjin virus, optionally associated with structural proteins. These vectors were administered to the mouse to evaluate the immune cell response. The authors stress the importance of the cell response, which is essentially stimulated by non-structural proteins and especially NS3, NS4A and NS4B. These articles reveal the difficulty in providing a good vaccination strategy against West Nile fever.

The present invention relates to a means for preventing and/or combating diseases caused by the WN virus.

Another objective of the invention is to propose such a means usable in different animal species sensitive to the disease caused by said virus and in particular equine and avian species.

Another objective of the invention is to propose immunization and vaccination methods for the target species.

Yet another objective of the invention is to propose means and methods making it possible to ensure a differential diagnosis.

Thus, the first object of the invention is *in vitro* and/or *in vivo* expression vectors comprising a polynucleotide encoding the envelope protein E of the WN virus. These vectors also comprise the elements necessary for the expression of the polynucleotide in the host cell.

In addition to the polynucleotide encoding E, the expression vectors according to the invention can comprise one or more other polynucleotides encoding other proteins of the WN virus, preferably structural proteins of the WN virus and said sequences are preferably chosen from among those encoding the pre-membrane protein prM and the membrane protein M.

The vector preferably comprises a polynucleotide forming a single encoding frame corresponding e.g. to prM-E, M-E and more particularly prM-M-E. A vector comprising several separate polynucleotides encoding the different proteins (e.g. prM and/or M and E) also falls within the scope of the present invention. The vector, more particularly *in vivo*, can also comprise polynucleotides corresponding to more than one WN virus strain, particularly two or more polynucleotides encoding E or prM-M-E of different strains. As will be shown hereinafter, the vector, particularly *in vivo*, can comprise one or more nucleotide sequences encoding immunogens of other pathogenic agents and/or cytokins.

According to a preferred embodiment of the invention, the expression vector comprises a polynucleotide encoding prM-M-E and preferably in a single reading frame.

The term polynucleotide encoding a protein of the WN virus mainly means a DNA fragment encoding said protein, or the complementary strand of said DNA fragment. An RNA is not excluded.

In the sense of the invention, the term protein covers fragments, including peptides and polypeptides. By definition, the protein fragment is immunologically active in the sense that once administered to the host, it is able to evoke an immune response of the humoral and/or cellular type directed against the protein. Preferably the protein fragment is such that it has substantially the same immunological activity as the total protein. Thus, a protein fragment according to the invention comprises at least one epitope or antigenic determinant. The term epitope relates to a protein site able to induce an immune reaction of the humoral type (B cells) and/or cellular type (T cells).

Thus, the minimum structure of the polynucleotide is that encoding an epitope or antigenic determinant of the protein in question. A polynucleotide encoding a fragment of the total protein more particularly comprises a minimum of 21 nucleotides, particularly at least 42 nucleotides and preferably at least 57, 87 or 150 consecutive nucleotides of the sequence in question. Epitope determination procedures are well known to the one skilled in the art and it is more particularly possible to use overlapping peptide libraries (Hemmer B. et al., Immunology Today, 1998, 19 (4), 163-168), Pepscan (Geysen H. M. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, 81 (13), 3998-4002; Geysen H. M. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, 82 (1), 178-182; Van der Zee R. et al., Eur. J. Immunol., 1989, 19 (1), 43-47; Geysen H. M., Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 1990, 21 (4), 523-533; Multipin® Peptide Synthesis Kits de Chiron) and algorithms (De Groot A. et al., Nature Biotechnology, 1999, 17, 533-561).

In particular the polynucleotides according to the invention comprise the nucleotide sequence encoding one or two transmembrane domains and preferably two of them, located in the terminal part C of the protein E.



For the WNV NY99 strain, these domains correspond to amino acid sequences 742 to 766 and 770 to 791 of GenBank AF196835.

Elements necessary for the expression of the polynucleotide or polynucleotides are present. In minimum manner, this consists of an initiation codon (ATG), a stop codon and a promoter, as well as a polyadenylation sequence for the plasmids and viral vectors other than poxviruses. When the polynucleotide encodes a polyprotein fragment, e.g. prM-E, M-E, prM-M-E, an ATG is placed at 5' of the reading frame and a stop codon is placed at 3'. As will be explained hereinafter, other elements making it possible to control the expression could be present, such as enhancer sequences, stabilizing sequences and signal sequences permitting the secretion of the protein.

The present invention also relates to preparations comprising such expression vectors. It more particularly relates to preparations comprising one or more *in vivo* expression vectors, comprising and expressing one or more of the above polynucleotides, including that encoding E, in a pharmaceutically acceptable excipient or vehicle.

According to a first embodiment of the invention, the other vector or vectors in the preparation comprise and express one or more other proteins of the WN virus, e.g. prM, M, prM-M.

According to another embodiment, the other vector or vectors in the preparation comprise and express one or more proteins of one or more other WN virus strains. In particular, the preparation comprises at least two vectors expressing, particularly *in vivo*, polynucleotides of different WN strains encoding the same proteins and/or for different proteins, preferably for the same proteins. This is more particularly a matter of vectors expressing *in vivo* E or prM-M-E of two, three or more different WN strains. The invention is also directed at mixtures of vectors expressing prM, M, E, prM-M, prM-E or M-E of different strains.

According to yet another embodiment and as will be shown in greater detail hereinafter, the other vector or vectors in the preparation comprise and express one or more cytokines and/or one or more immunogens of one or more other pathogenic agents.

The invention also relates to various combinations of these different embodiments.

The preparations comprising an *in vitro* or *in vivo* expression vector comprising and expressing a polynucleotide encoding prM-M-E constitute a preferred embodiment of the invention.

According to a special embodiment of the invention, the *in vivo* or *in vitro* expression vectors comprise as the sole polynucleotide or polynucleotides of the WN virus, a polynucleotide encoding the protein E, optionally associated with prM and/or M, preferably encoding prM-M-E and optionally a signal sequence of the WN virus.

According to a special embodiment, one or more of the non-structural proteins NS2A, NS2B and NS3 are expressed jointly with the structural proteins according to the invention, either via the same expression vector, or via their own expression vector. They are preferably expressed together on the basis of a single polynucleotide.

Thus, the invention also relates to an *in vivo* or *in vitro* expression vector comprising the polynucleotide encoding NS2A, NS2B, NS3, their combinations and preferably for NS2A-NS2B-NS3. Basically said vector can be one of the above-described vectors comprising a polynucleotide encoding one or more structural proteins, particularly E or prM-M-E. As an alternative, the invention relates to a preparation as described hereinbefore, also incorporating at least one of these vectors expressing a non-structural protein and optionally a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient.

In order to implement the expression vectors according to the invention, the one skilled in the art has various strains of the WN virus and the description of the nucleotide sequence of their genome, cf. particularly Savage H. M. et al. (Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999, 61 (4), 600-611), table 2, which refers to 24 WN virus strains and gives access references to polynucleotide sequences in GenBank.

Reference can e.g. be made to strain NY99 (GenBank AF196835). In GenBank, for each protein the corresponding DNA sequence is given (nucleotides 466-741 for prM, 742-966 for M, 967-2469 for E, or 466-2469 for prM-M-E, 3526-4218 for NS2A, 4219-4611 for NS2B and 4612-6468 for NS3, or 3526-6468 for NS2A-NS2B-NS3). By comparison and alignment of the sequences, the determination of a polynucleotide encoding such a protein in another WNV strain is immediate.

It was indicated hereinbefore that polynucleotide was understood to mean the sequence encoding the protein or a fragment or an epitope specific to the WN virus. Moreover, by equivalence, the term polynucleotide also covers the corresponding nucleotide sequences of the different WN virus strains and nucleotide sequences differing by the degeneracy of the code.

Within the family of WN viruses, identity between amino acid sequences prM-M-E relative to that of NY99 is equal to or greater than 90%. Thus, the invention covers polynucleotides encoding an amino acid sequence, whose identity with the native amino acid sequence is equal to or greater than 90%, particularly 92%, preferably 95% and more specifically 98%. Fragments of these homologous polynucleotides specific with respect to WN viruses, are also considered equivalents.

Thus, on referring to a polynucleotide of the WN virus, this term covers equivalent sequences within the sense of the invention.

It has also been seen that the term protein covers immunologically active peptides and polypeptides. For the requirements of the invention, it covers:

a) corresponding proteins of the different WN virus strains,

b) proteins differing therefrom, but maintaining with a native WN protein an identity equal to or greater than 90%, particularly 92%, preferably 95% and more specifically 98%.

Thus, on referring to a protein of the WN virus, this term covers equivalent proteins within the sense of the invention.

Different WN virus strains are accessible in collections, particularly in the American Type Culture Collection (ATCC), e.g. under access numbers VR-82 or VR-1267. The Kunjin virus is in fact considered to be a WN virus.

According to the invention, preferably the polynucleotide also comprises a nucleotide sequence encoding a signal peptide, located upstream of the expressed protein in order to ensure the secretion thereof. It can consequently be an endogenic sequence, i.e. the natural signal sequence when it exists (coming from the same WN virus or another strain). For example, for the NY99 WN virus, the endogenic signal sequence of E corresponds to nucleotides 922 to 966 of the GenBank sequence and for prM it is a matter of nucleotides 421 to 465. It can also be a nucleotide sequence encoding a heterologous signal peptide, particularly that encoding the signal peptide of the human tissue plasminogen activator (tPA) (Hartikka J. et al., Human Gene Therapy, 1996; 7, 1205-1217). The nucleotide sequence encoding the signal peptide is inserted in frame and upstream of the sequence encoding E or its combinations, e.g. prM-M-E.

According to a first embodiment of the invention, the *in vivo* expression vectors are viral vectors.

These expression vectors are advantageously poxviruses, e.g. the vaccinia virus, avipox viruses (in particular canarypox, fowlpox), swinepox, raccoonpox and camelpox, adenoviruses, such as avian, canine, porcine, bovine, human adenoviruses and herpes viruses, such as equine herpes virus (EHV serotypes 1 and 4), canine herpes virus (CHV), feline herpes virus (FHV), bovine herpes viruses (BHV serotypes 1 and 4), porcine herpes virus (PRV), Marek's disease virus (MDV serotypes 1 and 2), turkey herpes virus (HVT or MDV serotype 3), and duck herpes virus. When a herpes virus is used, the vector HVT is preferred for the vaccination of the avian species and the vector EHV for the vaccination of horses.

For poxviruses, the one skilled in the art can refer to WO-A-90/12882 and more particularly for the vaccinia virus to US-A-4,769,330; US-A-4,722,848; US-A-4,803,112; US-A-5,110,587; US-A-5,494,807; US-A-5,762,938; for fowlpox to US-A-5,174,993; US-A-5,505,941; US-5,768,599; for canarypox to US-A-5,756,103; for swinepox to US-A-5,382,425 and for raccoonpox to WO-A-00/03030.

When the expression vector is a vaccinia virus, the insertion sites for the polynucleotide or polynucleotides to be expressed are in particular the gene of thymidine kinase (TK), the gene of hemagglutinin (HA), the region of the inclusion body of the A type (ATI). In the case of canarypox, the insertion sites are more particularly located in or are constituted by ORFs C3, C5 and C6. In the case of fowlpox, the insertion sites are more particularly located in or constituted by the ORFs F7 and F8.

According to one of the preferred embodiments of the invention, the poxvirus expression vector is an ALVAC or a canarypox virus (for example of the strain Rentschler) which has been attenuated, particularly by more than 200 passages on chick embryo fibroblast (CEF) cells. A canarypox virus of ALVAC strain has been deposited the november 14, 1996 at the American Type Culture Collection (ATCC) under reference VR-2547. Other attenuated poxviruses can be used, particularly attenuated fowlpox (e.g. TROVAC) or attenuated vaccinia viruses (e.g. NYVAC). On TROVAC and NYVAC poxviruses, the one skilled in the art can refer to patent WO-A-96/40241.

- 10 Preferably, when the expression vector is a poxvirus, the polynucleotide to be expressed is inserted under the control of a specific poxvirus promoter, particularly the vaccine promoter 7.5 kDa (Cochran et al., J. Virology, 1985, 54, 30-35), the vaccine promoter 13L (Riviere et al., J. Virology, 1992, 66, 3424-3434), the vaccine promoter HA (Shida, Virology, 1988, 150, 451-457), the cowpox promoter ATI (Funahashi et al., J. Gen. Virol., 1988, 69, 35-47), or the vaccine promoter H6 (Taylor J. et al., Vaccine, 1988, 6, 504-508; Guo P. et al. J. Virol., 1989, 63, 4189-4198; Parkus M. et al., J. Virol., 1989, 63, 3829-3836).

- 20 When the expression vector is a herpes virus HVT, appropriate insertion sites are more particularly located in the BamHI I fragment or in the BamHI M fragment of HVT. The HVT BamHI I restriction fragment comprises several open reading frames (ORFs) and three intergene regions and comprises several preferred insertion zones, namely the three intergene regions 1, 2 and 3, which constitute preferred regions, and ORF UL55 (FR-A-2 728 795, US-A-5 980 908). The HVT BamHI M restriction fragment comprises ORF UL43, which is also a preferred insertion site (FR-A-2 728 794, US-A-5 733 554).

- 25 When the expression vector is an EHV-1 or EHV-4 herpes virus, appropriate insertion sites are in particular TK, UL43 and UL45 (EP-A-668355).

- 30 Preferably, when the expression vector is a herpes virus, the polynucleotide to be expressed is inserted under the control of a strong eukaryote promoter, preferably the CMV-IE promoter. These strong promoters are described hereinafter in the part of the description relating to plasmids.

According to a second embodiment of the invention, the *in vivo* expression vectors are plasmidic vectors known as plasmids.

- 35 The term plasmid covers any DNA transcription unit in the form of a polynucleotide sequence comprising a polynucleotide according to the invention and the elements necessary for its *in vivo* expression. Preferably there is a supercoiled or non-supercoiled, circular plasmid. The linear form also falls within the scope of the invention.

- 40 Each plasmid comprises a promoter able to ensure, in the host cells, the expression of the polynucleotide inserted under its dependency. In general, it is a strong eukaryote promoter. The preferred strong

eukaryot promoter is the early cytomegalovirus promoter (CMV-IE) of human or murine origin, or optionally having another origin such as the rat or guinea pig. The CMV-IE promoter can comprise the actual promoter part, which may or may not be associated with the enhancer part. Reference can be made to EP-A-260 148, EP-A-323 597, US-A-5 168 062, US-A-5 385 839, US-A-4 968 615, WO-A-87/03905. Preference is  
 5 given to human CMV-IE (Boshart M. et al., Cell., 1985, 41, 521-530) or murine CMV-IE.

In more general terms, the promoter has either a viral or a cellular origin. A strong viral promoter other than CMV-IE is the early/late promoter of the SV40 virus or the LTR promoter of the Rous sarcoma virus. A strong cellular promoter is the promoter of a gene of the cytoskeleton, such as e.g. the desmin promoter  
 10 (Kwissa M. et al., Vaccine, 2000, 18 (22), 2337-2344), or the actin promoter (Miyazaki J. et al., Gene, 1989, 79 (2), 269-277).

By equivalence, the subfragments of these promoters, maintaining an adequate promoting activity are included within the present invention, e.g. truncated CMV-IE promoters according to WO-A-98/00166. The  
 15 notion of the promoter according to the invention consequently includes derivatives and subfragments maintaining an adequate promoting activity, preferably substantially similar to that of the actual promoter from which they are derived. For CMV-IE, this notion comprises the actual promoter part and/or the enhancer part, as well as derivatives and subfragments.

Preferably, the plasmids comprise other expression control elements. It is in particular advantageous to incorporate stabilizing sequences of the intron type, preferably intron II of the rabbit  $\beta$ -globin gene (van  
 20 Ooyen et al., Science, 1979, 206: 337-344).

As the polyadenylation signal (polyA) for the plasmids and viral vectors other than poxviruses, use can more particularly be made of the one of the bovine growth hormone (bGH) gene (US-A-5 122 458), the one of the  
 25 rabbit  $\beta$ -globin gene or the one of the SV40 virus.

The other expression control elements usable in plasmids can also be used in herpes virus expression vectors.

According to another embodiment of the invention, the expression vectors are expression vectors used for the *in vitro* expression of proteins in an appropriate cell system. The proteins can be harvested in the culture supernatant after or not after secretion (if there is no secretion a cell lysis is done), optionally concentrated by conventional concentration methods, particularly by ultrafiltration and/or purified by  
 35 conventional purification means, particularly affinity, ion exchange or gel filtration-type chromatography methods.

Production takes place by the transfection of mammal cells by plasmids, by replication of viral vectors on mammal cells or avian cells, or by Baculovirus replication (US-A-4 745 051; Vieland J. et al., J. Virol., 1990  
 40 64 (1), 37-50; Verne A., Virology, 1988, 187, 58-71), e.g. Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus

AcNPV, on insect cells (e.g. Sf9 *Spodoptera frugiperda* cells, ATCC CRL 1711). Mammal cells which can be used are in particular hamster cells (e.g. CHO or BHK-21) or monkey cells (e.g. COS or VERO). Thus, the invention also covers expression vectors incorporating a polynucleotide according to the invention, the thus produced WN proteins or fragments and the preparations containing the same.

5

Thus, the present invention also relates to WN protein-concentrated and/or purified preparations. When the polynucleotide encodes several proteins, they are cleaved, and the aforementioned preparations then contain cleaved proteins.

- 10 The present invention also relates to immunogenic compositions and vaccines against the WN virus comprising at least one *in vivo* expression vector according to the invention and a pharmaceutically acceptable excipient or vehicle and optionally an adjuvant.

15

The immunogenic composition notion covers any composition which, once administered to the target species, induces an immune response directed against the WN virus. The term vaccine is understood to mean a composition able to induce an effective protection. The target species are equines, canines, felines, bovines, porcines, birds, preferably the horse, dog, cat, pig and in the case of birds geese, turkeys, chickens and ducks and which by definition covers reproducing animals, egg-layers and meat animals.

20

The pharmaceutically acceptable vehicles or excipients are well known to the one skilled in the art. For example, it can be a 0.9% NaCl saline solution or a phosphate buffer. The pharmaceutically acceptable vehicles or excipients also cover any compound or combination of compounds facilitating the administration of the vector, particularly the transfection, and/or improving preservation.

25

The doses and dose volumes are defined hereinafter in the general description of immunization and vaccination methods.

30

The immunogenic compositions and vaccines according to the invention preferably comprise one or more adjuvants, particularly chosen from among conventional adjuvants. Particularly suitable within the scope of the present invention are (1) polymers of acrylic or methacrylic acid, maleic anhydride and alkenyl derivative polymers, (2) immunostimulating sequences (ISS), particularly oligodeoxynucleotide sequences having one or more non-methylated CpG units (Klinman D. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1996, 93, 2879-2883; WO-A1-98/16247), (3) an oil in water emulsion, particularly the SPT emulsion described on p 147 of "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" published by M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, and the emulsion MF59 described on p 183 of the same work, (4) cation lipids containing a quaternary ammonium salt, (5) cytokins or (6) their combinations or mixtures.

35

The oil in water emulsion (3), which is particularly appropriate for viral vectors, can in particular be based on:

40

- light liquid paraffin oil (European pharmacopoeia type),
- isoprenoid oil such as squalane, squalene,



- oil resulting from the oligomerization of alkenes, particularly isobutene or decene,
- esters of acids or alcohols having a straight-chain alkyl group, more particularly vegetable oils, ethyl oleate, propylene glycol, di(caprylate/caprate), glycerol tri(caprylate/caprate) and propylene glycol dioleate,
- esters of branched, fatty alcohols or acids, particularly isostearic acid esters.

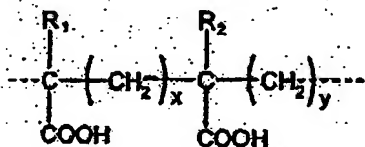
The oil is used in combination with emulsifiers to form the emulsion. The emulsifiers are preferably nonionic surfactants, particularly:

- esters of on the one hand sorbitan, mannide (e.g. anhydromannitol oleate), glycerol, polyglycerol or propylene glycol and on the other hand oleic, isostearic, ricinoleic or hydroxystearic acids, said esters being optionally ethoxylated,
- polyoxypropylene-polyoxyethylene copolymer blocks, particularly Pluronic®, especially L121.

Among the type (1) adjuvant polymers, preference is given to polymers of crosslinked acrylic or methacrylic acid, particularly crosslinked by polyalkenyl ethers of sugars or polyalcohols. These compounds are known under the name carbomer (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). The one skilled in the art can also refer to US-A-2 909 462, which describes such acrylic polymers crosslinked by a polyhydroxyl compound having at least three hydroxyl groups, preferably no more than eight such groups, the hydrogen atoms of at least three hydroxyl groups being replaced by unsaturated, aliphatic radicals having at least two carbon atoms. The preferred radicals are those containing 2 to 4 carbon atoms, e.g. vinyls, allyls and other ethylenically unsaturated groups. The unsaturated radicals can also contain other substituents, such as methyl. Products sold under the name Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, USA) are particularly suitable. They are in particular crosslinked by allyl saccharose or by allyl pentaerythritol. Among them particular reference can be made to Carbopol® 974P, 934P and 971P.

Among the maleic anhydride-alkenyl derivative copolymers, preference is given to EMA® (Monsanto), which are straight-chain or crosslinked ethylene-maleic anhydride copolymers and they are e.g. crosslinked by divinyl ether. Reference can be made to J. Fields et al., Nature 186: 778-780, June 4, 1960.

With regards to their structure, the acrylic or methacrylic acid polymers and EMA® are preferably formed by basic units having the following formula:



In which:

- R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, which can be the same or different, represent H or CH<sub>3</sub>



- $x = 0$  or  $1$ , preferably  $x = 1$
- $y = 1$  or  $2$ , with  $x + y = 2$ .

For EMA $\odot$ ,  $x = 0$  and  $y = 2$  and for carbomers  $x = y = 1$ .

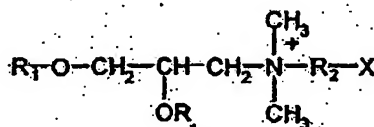
5

These polymers are dissolved in water or physiological salt solution (20 g/l NaCl) and the pH is adjusted to 7.3 to 7.4 by soda, in order to give the adjuvant solution in which the expression vectors will be incorporated.

10

The polymer concentration in the final vaccine composition can range between 0.01 and 1.5% w/v, more particularly 0.05 to 1% w/v and preferably 0.1 to 0.4% w/v.

The cationic lipids (4) containing a quaternary ammonium salt and which are particularly but not exclusively suitable for plasmids, are preferably those complying with the following formula:



15

In which  $R_1$  is a saturated or unsaturated straight-chain aliphatic radical having 12 to 18 carbon atoms,  $R_2$  is another aliphatic radical containing 2 or 3 carbon atoms and X is an amine or hydroxyl group.

Among these cationic lipids, preference is given to DMRIE (N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy)-1-propane ammonium : WO-A-96/34109), preferably associated with a neutral lipid,

20

preferably DOPE (dioleoyl-phosphatidyl-ethanol amine; Behr J. P., 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389) in order to form DMRIE-DOPE.

25

Preferably, the plasmid mixture with said adjuvant is formed extemporaneously and preferably, prior to its administration, the mixture formed in this way is given time to complex, e.g. for between 10 and 60 minutes and in particular approximately 30 minutes.

When DOPE is present, the DMRIE:DOPE molar ratio is preferably 95:5 to 5:95, more particularly 1:1.

30

The DMRIE or DMRIE-DOPE adjuvant:plasmid weight ratio is between 50:1 and 1:10, particularly 10:1 and 1:5 and preferably 1:1 and 1:2.

35

The cytokin or cytokins (5) can be supplied in protein form to the composition or vaccine, or can be co-expressed in the host with the immunogen or immunogens. Preference is given to the co-expression of the cytokin or cytokins, either by the same vector as that expressing the immunogen, or by its own vector.

The cytokins can in particular be chosen from among: Interleukin 18 (IL-18), Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 16 (IL-16), MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ; Marshall E. et al., Br. J. Cancer, 1997, 75 (12), 1715-1720), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor). Particular reference is made to avian cytokins, particularly those of the chicken, such as cIL-18 (Schneider K. et al., J. Interferon Cytokine Res., 2000, 20 (10), 879-883), cIL-15 (Xin K.-Q. et al., Vaccine, 1999, 17, 858-866), and equine cytokins, particularly equine GM-CSF (WO-A-00/77210). Preferably, use is made of cytokins of the species to be vaccinated.

WO-A-00/77210 describes the nucleotide sequence and the amino acid sequence corresponding to equine GM-CSF, the *in vitro* GM-CSF production and the construction of vectors (plasmids and viral vectors) permitting the *in vivo* equine GM-CSF expression. These proteins, plasmids and viral vectors can be used in immunogenic compositions and equine vaccines according to the invention. For example, use can be made of the plasmid pJP097 described in example 3 of said earlier-dated application or use can be made of the teaching of the latter in order to produce other vectors or for the *in vitro* production of equine GM-CSF and the incorporation of said vectors or said equine GM-CSF in immunogenic compositions or equine vaccines according to the invention.

The present invention also relates to immunogenic compositions and so-called subunit vaccines, incorporating the protein E and optionally one or more other proteins of the WN virus, particularly prM or M and preferably produced by *in vitro* expression in the manner described hereinbefore, as well as a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient.

The pharmaceutically acceptable vehicles or excipients are known to the one skilled in the art and can e.g. be 0.9% NaCl saline solution or phosphate buffer.

The immunogenic compositions and subunit vaccines according to the invention preferably comprise one or more adjuvants, particularly chosen from among conventional adjuvants. Particularly suitable within the scope of the present invention are (1) an acrylic or methacrylic acid polymer, a maleic anhydride and alkenyl derivative polymer, (2) an immunostimulating sequence (ISS), particularly an oligodeoxynucleotide sequence having one or more non-methylated CpG units (Klinman D. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2879-2883; WO-A1-96/16247), (3) an oil in water emulsion, particularly the emulsion SP1 described on p 147 of "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", published by M. Powell, M. Newmann, Plenum Press 1995, and the emulsion MF69 described on p 183 of the same work, (4) a water in oil emulsion (EP-A-639 071), (5) saponin, particularly Quil-A, or (6) alumina hydroxide or an equivalent. The different types of adjuvants defined under 1), 2) and 3) have been described in greater detail hereinbefore in connection with the expression vector-based vaccines.

The doses and dose volumes are defined hereinafter in connection with the general description of immunization and vaccination methods.

According to the invention, the vaccination against the WN virus can be combined with other vaccinations within the framework of vaccination programs, in the form of immunization or vaccination kits or in the form of immunogenic compositions and multivalent vaccines, i.e. comprising at least one vaccine component against the WN virus and at least one vaccine component against at least one other pathogenic agent. This also includes the expression by the same expression vector of genes of at least two pathogenic agents, including the WN virus.

The invention also relates to a multivalent immunogenic composition or a multivalent vaccine against the WN virus and against at least one other pathogen of the target species, using the same *in vivo* expression vector containing and expressing at least one polynucleotide of the WN virus according to the invention and at least one polynucleotide expressing an immunogen of another pathogen.

The thus expressed "immunogen" is understood to mean a protein, glycoprotein, polypeptide, peptide, epitope or derivative, e.g. fusion protein, inducing an immune response, preferably of a protective nature.

As was stated hereinbefore, these multivalent compositions or vaccines also comprise a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient, and optionally an adjuvant.

The invention also relates to an multivalent immunogenic composition or a multivalent vaccine comprising at least one *in vivo* expression vector in which at least one polynucleotide of the WN virus is inserted and at least a second expression vector in which a polynucleotide encoding a immunogen of another pathogenic agent is inserted. As stated before, those multivalent compositions or vaccines also comprise a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient, and optionally an adjuvant.

For the immunogenic compositions and multivalent vaccines, the other equine pathogens are more particularly chosen from among the group including viruses of equine rhinopneumonia EHV-1 and/or EHV-4 (and preferably there is a combination of immunogens of EHV-1 and EHV-4), equine influenza virus EIV, eastern encephalitis virus EEV, western encephalitis virus WEV, Venezuelan encephalitis virus VEV (preference is given to a combination of the three EEV, WEV and VEV), *Clostridium tetani* (tetanus) and their mixtures. Preferably, for EHV a choice is made of the genes gB and/or gD; for EIV the genes HA, NP and/or N; for viruses of encephalitis C and/or E2; and for *Clostridium tetani* the gene encoding all or part of the subunit C of the tetanic toxin. This includes the use of polynucleotides encoding an immunologically active fragment or an epitope of said immunogen.

The other avian pathogens are more particularly chosen from among the group including Marek's disease viruses MDV (serotypes 1 and 2, preferably 1), Newcastle disease virus NDV, Gumboro disease virus IBDV, infectious bronchitis virus IBV, infectious anaemia virus CAV, infectious laryngotracheitis virus ILTV, encephalomyelitis virus AEV (or avian leukosis virus ALV), virus of hemorrhagic enteritis of turkeys (HEV), pneumovirus TRTV, fowl plague virus (avian influenza), chicken hydropericarditis virus, avian reoviruses, *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Haemophilus avium*,

*Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella multocida gallicida*, and mixtures thereof. Preferably, for MDV a choice is made of the genes gB and/or gD; for NDV the genes HN and/or F; for IBDV the gene VP2; for IBV the genes S (more particularly S1), M and/or N; for CAV the genes VP1 and/or VP2; for ILTV the genes gB and/or gD; for AEV the genes env and/or gag/pro; for HEV the genes 100K and hexon; for TRTV the genes F and/or G and for fowl plague the genes HA, N and/or NP. This includes the use of polynucleotides encoding an immunologically active fragment or an epitope of said immunogen.

By way of example, in a multivalent immunogenic composition or a multivalent vaccine according to the invention, to which an adjuvant has optionally been added in the manner described hereinbefore and which is intended for the equine species, it is possible to incorporate one or more of the plasmids described in WO-A-98/03198 and particularly in examples 8 to 25 thereof, and those described in WO-A-00/77043 and which relate to the equine species, particularly those described in examples 8 and 7 thereof. For the avian species, it is e.g. possible to incorporate one or more of the plasmids described in WO-A1-98/03659, particularly in examples 7 to 27 thereof.

The immunogenic compositions or recombinant vaccines as described hereinbefore can also be combined with at least one conventional vaccine (inactivated, live attenuated, subunits) directed against at least one other pathogen.

In the same way, the immunogenic compositions and subunit vaccines according to the invention can form the object of combined vaccination. Thus, the invention also relates to multivalent immunogenic compositions and multivalent vaccines comprising one or more proteins according to the invention and one or more immunogens (the term immunogen having been defined hereinbefore) of at least one other pathogenic agent (particularly from among the above list) and/or another pathogenic agent in inactivated or attenuated form. In the manner described hereinbefore, these multivalent vaccines or compositions also incorporate a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient and optionally an adjuvant.

The present invention also relates to methods for the immunization and vaccination of the target species referred to hereinbefore.

These methods comprise the administration of an effective quantity of an immunogenic composition or vaccine according to the invention. This administration can more particularly take place by the parenteral route, e.g. by subcutaneous, intradermic or intramuscular administration, or by oral and/or nasal routes.

The different vaccines can be injected by a needleless, liquid jet injector. For plasmids it is also possible to use gold particles coated with plasmid and ejected in such a way as to penetrate the cells of the skin of the subject to be immunized (Tang et al., Nature 1992, 356, 162-164).

The immunogenic compositions and vaccines according to the invention comprise an effective expression vector or polypeptide quantity.

In the case of immunogenic compositions or vaccines based on plasmid, a dose consists in general terms about in 10 µg to about 2000 µg, particularly about 50 µg to about 1000 µg. The dose volumes can be between 0.1 and 2 ml, preferably between 0.2 and 1 ml.

5

These doses and dose volumes are suitable for the vaccination of equines and mammals.

For the vaccination of the avian species, a dose is more particularly between about 10 µg and about 500 µg and preferably between about 50 µg and about 200 µg. The dose volumes can in particular be between 0.1 and 1 ml, preferably between 0.2 and 0.5 ml.

10

The one skilled in the art has the necessary skill to optimize the effective plasmid dose to be used for each immunization or vaccination protocol and for defining the optimum administration route.

15

In the case of immunogenic compositions or vaccines based on poxviruses, a dose is in general terms between about  $10^2$  pfu and about  $10^9$  pfu.

For the equine species and mammals, when the vector is the vaccinia virus, the dose is more particularly between about  $10^4$  pfu and about  $10^9$  pfu, preferably between about  $10^6$  pfu and about  $10^8$  pfu and when the vector is the canarypox virus, the dose is more particularly between about  $10^5$  pfu and about  $10^9$  pfu and preferably between about  $10^{4.5}$  pfu or  $10^6$  pfu and about  $10^8$  pfu.

20

For the avian species, when the vector is the canarypox virus, the dose is more particularly between about  $10^3$  pfu and about  $10^7$  pfu, preferably between about  $10^4$  pfu and about  $10^6$  pfu and when the vector is the fowlpox virus, the dose is more particularly between about  $10^2$  pfu and about  $10^8$  pfu, preferably between about  $10^3$  pfu and about  $10^5$  pfu.

25

In the case of immunogenic compositions or vaccines based on the viral vector other than poxviruses, particularly herpes viruses, a dose is generally between about  $10^2$  pfu and about  $10^8$  pfu. In the case of immunogenic compositions or avian vaccines a dose is generally between about  $10^3$  pfu and about  $10^8$  pfu. In the case of immunogenic compositions or equine vaccines a dose is generally between about  $10^6$  pfu and about  $10^8$  pfu.

30

The dose volumes of the immunogenic compositions and equine vaccines based on viral vectors are generally between 0.5 and 2.0 ml, preferably between 1.0 and 2.0 ml, preferably 1.0 ml. The dose volumes of immunogenic compositions and avian vaccines based on viral vectors are generally between 0.1 and 1.0 ml, preferably between 0.1 and 0.5 ml and more particularly between 0.2 and 0.3 ml. Also in connection with such a vaccine, the one skilled in the art has the necessary competence to optimize the number of administrations, the administration route and the doses to be used for each immunization protocol.

35

40

In the case of immunogenic compositions or subunit vaccines, a dose comprises in general terms about 10 µg to about 2000 µg, particularly about 50 µg to about 1000 µg. The dose volumes of the immunogenic compositions and equine vaccines based on viral vectors are generally between 1.0 and 2.0 ml, preferably between 0.5 and 2.0 ml and more particularly 1.0 ml. The dose volumes of the immunogenic compositions and avian vaccines based on viral vectors are generally between 0.1 and 1.0 ml, preferably between 0.1 and 0.5 ml, and more particularly between 0.2 and 0.3 ml. Also for such a vaccine, the one skilled in the art has the necessary skill to optimize the number of administrations, the administration route and the doses to be used for each immunization protocol.

10 The invention also relates to the use of an *in vivo* expression vector or a preparation of vectors or polypeptides according to the invention for the preparation of an immunogenic composition or a vaccine intended to protect target species against the WN virus and possibly against at least one other pathogenic agent. The different characteristics indicated in the description are applicable to this object of the invention.

15 A vaccine based on plasmid or a viral vaccine expressing one or more proteins of the WN virus or a WN subunit vaccine according to the present invention will not induce in the vaccinated animal the production of antibodies against other proteins of said virus, which are not represented in the immunogenic composition or vaccine. This feature can be used for the development of differential diagnostic methods making it possible to make a distinction between animals infected by the WN pathogenic virus and animals vaccinated with  
20 vaccines according to the invention. In the former, these proteins and/or antibodies directed against them are present and can be detected by an antigen-antibody reaction. This is not the case with the animals vaccinated according to the invention, which remain negative. In order to bring about this discrimination, use is made of a protein which is not represented in the vaccine (not present or not expressed), e.g. protein C or protein NS1, NS2A, NS2B or NS3 when it is not represented in the vaccine.

25 Thus, the present invention relates to the use of vectors, preparations and polypeptides according to the invention for the preparation of immunogenic compositions and vaccines making it possible to discriminate between vaccinated animals and infected animals.

30 It also relates to an immunization and vaccination method associated with a diagnostic method permitting such a discrimination.

The protein selected for the diagnosis or one of its fragments or epitopes is used as the antigen in the diagnostic test and/or is used for producing polyclonal or monoclonal antibodies. The one skilled in the art  
35 has sufficient practical knowledge to produce these antibodies and to implement antigens and/or antibodies in conventional diagnostic methods, e.g. ELISA tests.

The invention will now be described in greater detail using embodiments considered as non-limitative examples.

40



## Examples

All the constructions are implemented using standard molecular biology methods (cloning, digestion by restriction enzymes, synthesis of a complementary single-strand DNA, polymerase chain reaction, elongation of an oligonucleotide by DNA polymerase...) described by Sambrook J. et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). All the restriction fragments used for the present invention, as well as the various polymerase chain reaction (PCR) fragments are isolated and purified using the GeneClean® kit (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

### 10 Example 1: Culture of the West Nile fever virus

For their amplification, West Nile fever viruses NY99 (Lancioti R. S. et al., Science, 1999, 286, 2333-7)) are cultured on VERO cells (monkey renal cells), obtainable from the American Type Culture Collection (ATCC) under no. CCL-81.

15 The VERO cells are cultured in 25 cm<sup>2</sup> Falcon with eagle-MEM medium supplemented by 1% yeast extracts and 10% calf serum containing approximately 100,000 cells/ml. The cells are cultured at +37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

20 After three days the cellular layer reaches to confluence. The culture medium is then replaced by the eagle-MEM medium supplemented by 1% yeast extracts and 0.1% cattle serum albumin and the West Nile fever virus is added at a rate of 5 pfu/cell.

25 When the cytopathogenic effect (CPE) is complete (generally 48 to 72 hours after the start of culturing), the viral suspensions are harvested and then clarified by centrifugation and frozen at -70°C. In general, three to four successive passages are necessary for producing a viral batch, which is stored at -70°C.

### Example 2: Extraction of viral RNA from the West Nile fever virus

30 The viral RNA contained in 100 ml of viral suspension of the West Nile fever virus strain NY99 is extracted after thawing with solutions of the High Pure Viral RNA Kit Cat # 1 858 882, Roche Molecular Biochemicals, whilst following the instructions of the supplier for the extraction stages. The RNA sediment obtained at the end of extraction is resuspended with 1 to 2 ml of RNase-free, sterile distilled water.

### 35 Example 3: Construction of plasmid pFC 101

The complementary DNA (DNAC) of the West Nile fever virus NY99 is synthesized with the Gene Amp RNA PCR Kit (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) using the conditions supplied by the manufacturer.



A reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR reaction) is carried out with 50 µl of viral RNA suspension of the West Nile fever virus NY99 (example 2) and with the following oligonucleotides:

CF101 (30 mer) (SEQ ID NO:1)

5'TTTTITGAATTCGTTACCCCTCTCTAACTTC 3'

5 and FC102 (33 mer) (SEQ ID NO:2)

5'TTTTTTCTAGATTACCTCCGACTGCGTCTTGA 3'

This pair of oligonucleotides allows the incorporation of an EcoRI restriction site, a XbaI restriction site and a stop codon at 3' of the insert.

The synthesis of the first DNA strand takes place by elongation of oligonucleotide FC102, following the hybridization of the latter with the RNA matrix.

The synthesis conditions of the first DNA strand are a temperature of 42°C for 15 min, then 99°C for 5 min and finally 4° for 5 min. The conditions of the PCR reaction in the presence of the pair of oligonucleotides FC101 and FC102 are a temperature of 95°C for 2 min, then 35 cycles (95°C for 1 min, then 62°C for 1 min and 72°C for 2 min) and finally 72°C for 7 min to produce a 302 bp fragment.

This fragment is digested by EcoRI and then by XbaI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, the approximately 290 bp EcoRI-XbaI fragment, which is called fragment A.

The pVR1020 eukaryote expression plasmid (C. J. Luke et al. of Infectious Diseases, 1997, 175, 95-97) derived from the plasmid pVR1012 (fig. 1 and example 7 of WO-A-98/03199 - Hartikka J. et al., 1997, Human Gene Therapy; 7, 1205-1217), contains the frame encoding the signal sequence of human tissue plasminogen activator (tPA).

A pVR1020 plasmid is modified by BamHI-BglII digestion and insertion of a sequence containing several cloning sites (BamHI, NotI, EcoRI, XbaI, PmlI, PstI, BglII) and resulting from the hybridization of the following oligonucleotides.

BP326 (40 mer) (SEQ ID NO: 3)

5'GATCTGCAGCACGTGTCTTAGAGGATATCGAATTCGCGGCC 3' and

BP329 (40 mer) (SEQ ID No: 4)

5'GATCGCGCGCCGCGAATTCGATATCCTCTAGACACGTGCT 3'

The thus obtained vector with a size of approximately 5105 base pairs (or bp) is called pAB110.

Fragment A is ligated with the pAB110 expression plasmid previously digested by XbaI and EcoRI, in order to give the plasmid pFC101 (5376 bp). Under the control of the early promoter of human

cytomegalovirus or hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), said plasmid contains an insert encoding the signal sequence of the activator of tPA followed by the sequence encoding the protein pM.

#### Example 4: Construction of plasmid pFC102

The complementary DNA (DNAc) of the West Nile fever virus NY99 is synthesized with the Gene Amp RNA PCR Kit (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) using the conditions provided by the supplier.

A reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR reaction) takes place with 50 µl of viral RNA suspension of the West Nile fever virus NY99 (example 2) and with the following oligonucleotides:

FC103 (30 mer) (SEQ ID NO: 5)

5' TTTT TGAATTCTCACTGACAGTGCAGACA 3'

and FC104 (33 mer) (SEQ ID NO: 6)

5' TTTT TTTCTAGATTAGCTGTAAGCTGGGGCCAC 3'

This pair of oligonucleotides allows the incorporation of an EcoRI restriction site, a XbaI restriction site and a stop codon at 3' of the insert.

The first DNAc strand is synthesized by elongation of oligonucleotide FC104, following the hybridization of the latter on the RNA matrix.

The synthesis conditions of the first DNAc strand are a temperature of 42°C for 15 min, then 99°C for 5 min and finally 4°C for 5 min. The conditions of the PCR reaction in the presence of the pair of oligonucleotides FC103 and FC104 are a temperature of 95°C for 2 min, then 35 cycles (95°C for 1 min, then 62°C for 1 min and 72°C for 2 min) and finally 72°C for 7 min to produce a 252 bp fragment.

This fragment is digested by EcoRI and then XbaI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, the approximately 240 bp EcoRI-XbaI fragment. This fragment is ligated with the pAB110 expression plasmid (example 3) previously digested by XbaI and EcoRI in order to give the plasmid pFC102 (5326 bp). Under the control of the early human cytomegalovirus or hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early) promoter, this plasmid contains an insert encoding the signal sequence of the activator of tPA, followed by the sequence encoding the protein M.

#### Example 5: Construction of plasmid pFC103

The complementary DNA (DNAc) of the West Nile fever virus NY99 is synthesized with the Gene Amp RNA PCR Kit (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) using the conditions provided by the supplier.

A reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR reaction) takes place with 50 µl of viral RNA suspension of the West Nile fever virus NY99 (example 2) and with the following oligonucleotides:

FC105 (30 mer) (SEQ ID NO: 7)

5'TTTTGAATTCTTCAACTGCCTTGGGAATG 3'

and FC106 (33 mer) (SEQ ID NO: 8)

5'TTTTCTAGATTAAGCGTGCACGTTACGGA 3'.

This pair of oligonucleotides allows the incorporation of an EcoRI restriction site and a XbaI restriction site, together with a stop codon at 3' of the insert.

The synthesis of the first DNAc strand takes place by elongation of oligonucleotide FC106, following its hybridization with the RNA matrix.

The synthesis conditions of the first DNAc strand are a temperature of 42°C for 15 min, then 99°C for 5 min and finally 4°C for 5 min. The PCR reaction conditions in the presence of the pair of oligonucleotides FC105 and FC106 are a temperature of 95°C for 2 min, then 35 cycles (95°C for 1 min, then 62°C for 1 min and 72°C for 2 min), and finally 72°C for 7 min for producing a 1530 bp fragment.

This fragment is digested by EcoRI and then by XbaI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, the approximately 1518 bp EcoRI-XbaI fragment. This fragment is ligated with the pAB 110 expression plasmid (example 3) previously digested by XbaI and EcoRI in order to give the plasmid pFC103 (6604 bp). Under the control of the early promoter of human cytomegalovirus or hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), said plasmid contains an insert encoding the signal sequence of the enhancer of tPA, followed by the sequence encoding the protein E.

#### Example 6: Construction of plasmid pFC104

The complementary DNA (DNAc) of the West Nile fever virus NY99 is synthesized with the Gene Amp RNA PCR Kit (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT-06859, USA) using the conditions provided by the supplier.

A reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR reaction) takes place with 50 µl of viral RNA suspension of the West Nile fever virus NY99 (example 2) and with the following oligonucleotides:

FC101 (30 mer) (SEQ ID NO :1)

and FC106 (33 mer) (SEQ ID NO :8)

This pair of oligonucleotides allows the incorporation of an EcoRI restriction site, a XbaI restriction site and a stop codon at 3' of the insert.

Synthesis of the first DNAc strand takes place by elongation of oligonucleotide FC106, following its hybridization with the RNA matrix.

The synthesis conditions of the first DNAc strand are a temperature of 42°C for 15 min, then 99°C for 5 min and finally 4°C for 5 min. The PCR reaction conditions in the presence of the pair of oligonucleotides FC101 and FC106 are a temperature of 95°C for 2 min, then 35 cycles (95°C for 1 min, then 62°C for 1 min and 72°C for 2 min) and finally 72°C for 7 min in order to produce a 2031 bp fragment.

This fragment is digested by EcoRI and then XbaI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, the approximately 2019 bp EcoRI-XbaI fragment. This fragment is ligated with the pAB110 expression plasmid (example 3), previously digested by XbaI and EcoRI in order to give the pFC104 plasmid (7105 bp). Under the control of the early human cytomegalovirus promoter or hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), said plasmid contains an insert encoding the signal sequence of the activator of tPA, followed by the sequence encoding the protein prM-M-E.

#### Example 7: Construction of plasmid pFC105

The complementary DNA (DNAc) of the West Nile fever virus NY99 is synthesized with the Gene Amp RNA PCR Kit (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) using the conditions provided by the supplier.

A reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR reaction) takes place with 50 µl of viral RNA suspension of the West Nile fever virus NY99 (example 2) and with the following oligonucleotides:

CF107 (36 mer) (SEQ ID NO :9)

5'TTTTGTGATATCACCGGAATTGCAGTCATGATTGGC 3'

and FC106 (33 mer) (SEQ ID NO :8).

This pair of oligonucleotides allows the incorporation of an EcoRV restriction site, a XbaI restriction site and a stop codon at 3' of the insert.

Synthesis of the first DNAc strand takes place by elongation of the FC106 oligonucleotide, following its hybridization with the RNA matrix.

The synthesis conditions of the first DNAc strand are a temperature of 42°C for 15 min, then 99°C for 5 min and finally 4°C for 5 min. The PCR reaction conditions in the presence of the pair of oligonucleotides FC106 and FC107 are a temperature of 95°C for 2 min, then 35 cycles (95°C for 1 min, then 62°C for 1 min and 72°C for 2 min) and finally 72°C for 7 min in order to produce a 2076 bp fragment.

This fragment is digested by EcoRV and then XbaI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, the approximately 2058 bp EcoRV-XbaI fragment.

This fragment is ligated with the pVR1012 expression plasmid, previously digested by XbaI and EcoRV, in order to give the plasmid pFC105 (6953 bp). Under the control of the early human cytomegalovirus promoter or hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), this plasmid contains an insert encoding the polyprotein pM-M-E.

#### Example 8: Construction of plasmid pFC106

The complementary DNA (DNAC) of the West Nile fever virus NY99 is synthesized with the Gene Amp RNA PCR Kit (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) using the conditions provided by the supplier.

A reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR reaction) takes place with 50 µl of viral RNA suspension of the West Nile fever virus NY99 (example 2) and with the following oligonucleotides:

FC108 (38 mer) (SEQ ID NO :10)

5'TTTTTTGATATCATGTATAATGCTGATATGATTGAC 3'

and FC109 (36 mer) (SEQ ID NO :11)

5'TTTTTTCTAGATTAACGTTTCCCGAGGCGAAGTC 3'

This pair of oligonucleotides allows the incorporation of an EcoRV restriction site, a XbaI restriction site, an initiating ATG codon in 5' and a stop codon at 3' of the insert.

Synthesis of the first DNAC strand takes place by elongation of the oligonucleotide FC109, following its hybridization with the RNA matrix.

The synthesis conditions of the first DNAC strand are a temperature of 42°C for 15 min, then 99°C for 5 min and finally 4°C for 5 min. The PCR reaction conditions in the presence of the pair of nucleotides FC108 and FC109 are a temperature of 95°C for 2 min, then 35 cycles (95°C for 1 min, 62°C for 1 min and then 72°C for 2 min) and finally 72°C for 7 min to produce a 2973 bp fragment.

This fragment is digested by EcoRV and then XbaI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, the approximately 2953 bp EcoRV-XbaI fragment.

This fragment is ligated with the pVR 1012 expression plasmid previously digested by XbaI and EcoRV in order to give the plasmid pFC106 (7850 bp). Under the control of the early human cytomegalovirus promoter or hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), this plasmid contains an insert encoding the polyprotein NS2A-NS2B-NS3.

#### Example 9: Construction of the donor plasmid for insertion in site C5 of the ALVAC canarypox virus

Fig. 16 of US patent 5,756,103 shows the sequence of a genomic DNA 3199 bp fragment of the canarypox virus. Analysis of this sequence has revealed an open reading frame (ORF) called C5L, which commences at position 1538 and ends at position 1869. The construction of an insertion plasmid leading to the deletion of the ORF C5L and its replacement by a multiple cloning site flanked by transcription and translation stop signals was implemented in the following way.

A PCR reaction was performed on the basis of the matrix constituted by genomic DNA of the canarypox virus and with the following oligonucleotides:

C5A1 (42 mer) (SEQ ID NO :12):

5'ATCATCGAGCTCCAGCTGTAATTCATGGTCGAAAAGAAGTGC 3'

and C5B1 (73 mer) (SEQ ID NO :13):

5'GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTCTTTATAGCTAATTAGTCATTTTGGAGAGTACCACTTCAGCTA  
CCTC 3'

In order to isolate a 223 bp PCR fragment (fragment B).

A PCR reaction was carried out on the basis of the matrix constituted by genomic DNA of the canarypox virus and with the following oligonucleotides:

C5C1 (72 mer) (SEQ ID NO :14):

5'CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCCTTTTATTGATTAAGTCAATTATAAAGATCTAAAATGCATAAT  
TTC 3'

and C5D1 (45 mer) (SEQ ID NO :15):

5'GATGATGGTAGCGTAAACAAATATAATGAAAAGTATTCTAAACTA 3'

In order to isolate a 482 bp PCR fragment (fragment C).

Fragments B and C were hybridized together in order to serve as a matrix for a PCR reaction performed with the oligonucleotides C5A1 (SEQ ID NO :12) and C5D1 (SEQ ID NO :15) in order to generate a 681 bp PCR fragment. This fragment was digested by the restriction enzymes SacI and KpnI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, a 684 bp SacI-KpnI fragment. This fragment was ligated with the blueScript® II SK+ vector (Stratagene, La Jolla, USA, Cat # 212205), previously digested by the restriction enzymes SacI and KpnI, in order to give the plasmid pC5L. The sequence of this plasmid was verified by sequencing. This plasmid contains 166 bp of sequences upstream of ORF C5L (left flanking arm C5), an early transcription stop vaccine signal, stop codons in 6 reading frames, a multiple cloning site containing restriction sites SmaI, PstI, XhoI and EcoRI and finally 425 bp of sequences located downstream of ORF C5L (right flanking arm C5).

The plasmid pMP528HRH (Perkus M. et al. J. Virol. 1989, 63, 3829-3836) was used as the matrix for amplifying the complete sequence of the vaccine promoter H8 (GenBank access no. M28351) with the following oligonucleotides:

JCA291 (34 mer) (SEQ ID NO :16)

5'AAACCCGGGTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTG 3'

and JCA292 (43 mer) (SEQ ID NO :17)

5'AAAAGAATTCGTGCTACGATACAACTTAACGGATATCGCG 3'

In order to amplify a 149 bp PCR fragment. This fragment was digested by restriction enzymes SmaI and EcoRI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, a 138 bp SmaI-EcoRI restriction fragment.

- 5 This fragment was then ligated with the plasmid pC5L, previously digested by SmaI and EcoRI, in order to give the plasmid pFC107.

#### Example 10: Construction of the recombinant virus vCP1712

- 10 A PCR reaction was performed using the plasmid pFC105 (example 7) as the matrix and the following oligonucleotides:

FC110 (33 mer (SEQ ID NO : 18):

5'TTTTCGCGAACCAGGAATTGCAGTCATGATTGGC 3'

and FC111 (39 mer) (SEQ ID NO : 19):

- 15 5'TTTTGTGCGACGCGCCGCTTAAGCGTGACGTTACGGA 3'

In order to amplify an approximately 2079 bp PCR fragment. This fragment was digested by restriction enzymes NruI and Sall in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, an approximately 2068 bp NruI-Sall restriction fragment. This fragment was then ligated with plasmid pFC107 (example 9) previously digested by restriction enzymes NruI and Sall in order to give the plasmid pFC108.

- 20 Plasmid pFC108 was linearized by NotI, then transfected in primary chicken embryo cells infected with the canarypox virus (ALVAC strain) according to the previously described calcium phosphate precipitation method (Paricelli et Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982, 79, 4927-4931; Piccini et al. in Methods in Enzymology, 1987, 153, 545-563, publishers Wu R. and Grossman L. Academic Press). Positive plaques  
25 were selected on the basis of a hybridization with a radioactively labelled probe specific to the nucleotide sequence of the envelope glycoprotein E. These plaques underwent 4 successive selection/purification cycles until a pure population was isolated. A representative plaque corresponding to *in vitro* recombination between the donor plasmid pFC108 and the genome of the ALVAC canarypox virus was then amplified and the recombinant virus stock obtained was designated vCP1712.

- 30 Example 11: Construction of the recombinant virus vCP1713

- Plasmid pFC104 (example 6) was digested by the restriction enzyme Sall and PmlI in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, an approximately 2213 bp PmlI-Sall restriction fragment. This  
35 fragment was ligated with plasmid pFC107 (example 9) previously digested by the NruI and Sall restriction enzymes in order to give the plasmid pFC109.

- Plasmid pFC109 was linearized by NotI, then transfected in primary chicken embryo cells infected with the canarypox virus (ALVAC strain) according to the method of example 10. A representative plaque  
40 corresponding to *in vitro* recombination between the donor plasmid pFC109 and the genome of the ALVAC



canarypox virus was selected on the basis of a hybridization of a radioactively labelled probe specific to the nucleotide sequence of the envelope glycoprotein E and was then amplified. The recombinant virus stock obtained was designated vCP1713.

#### 5 Example 12: Construction of the recombinant virus vCP1714

10 Plasmid pFC103 (example 5) was digested by the Sall and PmlI restriction enzymes in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, an approximately 1712 bp PmlI-Sall restriction fragment. This fragment was ligated with the plasmid pFC107 (example 9) previously digested by the NruI and Sall restriction enzymes in order to give the plasmid pFC110.

15 Plasmid pFC110 was linearized by NotI, then transfected in primary chicken embryo cells infected with the canarypox virus (ALVAC strain) according to the method of example 10. A representative *in vitro* recombination range between the donor plasmid pFC110 and the genome of the ALVAC canarypox virus was selected on the basis of a hybridization with a radioactively labelled probe specific to the nucleotide sequence of the envelope glycoprotein E and was then amplified. The recombinant virus stock obtained was then designated vCP1714.

#### 20 Example 13: Construction of the recombinant virus vCP1715

Plasmid pFC102 (example 4) was digested by the Sall and PmlI restriction enzymes in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, an approximately 434 bp PmlI-Sall restriction fragment. This fragment was ligated with the plasmid pFC107 (example 9) previously digested by the NruI and Sall restriction enzymes to give the plasmid pFC111.

25 Plasmid pFC111 was linearized by NotI, then transfected in primary chicken embryo cells infected with the canarypox virus (ALVAC strain) according to the method of example 10. A representative plaque corresponding to *in vitro* recombination between the donor plasmid pFC111 and the genome of the ALVAC canarypox virus was selected on the basis of hybridization with a radioactively labelled probe specific to the nucleotide sequence of the membrane M glycoprotein and was then amplified. The recombinant virus stock obtained was designated vCP1716.

#### 30 Example 14: Construction of the recombinant virus vCP1718

35 Plasmid pFC101 (example 3) is digested by the Sall and PmlI restriction enzymes in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, an approximately 484 bp PmlI-Sall restriction fragment. This fragment is ligated with the plasmid pFC107 (example 9) previously digested by the NruI and Sall restriction enzymes to give the plasmid pFC112.

Plasmid pFC112 was linearized by NotI and then transfected in primary chicken embryo cells infected with the canarypox virus (ALVAC strain) according to the method of example 10. A representative plaque corresponding to *in vitro* recombination between the donor plasmid pFC112 and the genome of the ALVAC canarypox virus was selected on the basis of a hybridization with a radioactively labelled probe specific to the nucleotide sequence of the pre-membrane pM glycoprotein and was then amplified. The recombinant virus stock obtained was designated vCP1716.

Example 15: Construction of the donor plasmid for insertion in site C6 of the ALVAC canarypox virus

Fig. 4 of WO-A-01/05934 shows the sequence of a 3700 bp genomic DNA fragment of the canarypox virus. Analysis of this sequence revealed an open reading frame (ORF) called C6L, which starts at position 377 and ends at position 2254. The construction of an insertion plasmid leading to the deletion of the ORF C6L and its replacement by a multiple cloning site flanked by transcription and translation stop signals was implemented in the following way.

A PCR reaction was performed on the basis of the matrix constituted by the genomic DNA of the canarypox virus and with the following oligonucleotides:

C6A1 (42 mer) (SEQ ID NO :20):

5'ATCATCGAGCTCGCGGCCGCTATCAAAAGTCTTAATGAGTT 3'

and C6B1 (73 mer) (SEQ ID NO :21):

5'GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGTTTATATAGCTAATTAGTCATTTTTCGTAAGTAAGTATTTTATT TAA 3'

to isolate a 432 bp PCR fragment (fragment D).

A PCR reaction was performed on the basis of the matrix constituted by the genomic DNA of the canarypox virus and with the following oligonucleotides:

C6C1 (72 mer) (SEQ ID NO :22):

5'CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATCTTTTATTGATTAAGTCAATGAGTATATATAATTGAAAAAG TAA 3'

and C6D1 (45 mer) (SEQ ID NO :23):

5'GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAACTTAAGTTG 3'

to isolate a 1210 bp PCR fragment (fragment E).

Fragments D and E were hybridized together to serve as a matrix for a PCR reaction performed with the oligonucleotides C6A1 (SEQ ID NO :20) and C6D1 (SEQ ID NO :23) to generate a 1630 bp PCR fragment. This fragment was digested by the SacI and KpnI restriction enzymes to isolate, after agarose gel electrophoresis, a 1613 bp SacI-KpnI fragment. This fragment was ligated with the blueScript® II SK+ vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA, Cat # 212205) previously digested by the SacI and KpnI restriction enzymes to give the plasmid pC6L. The sequence of this plasmid was verified by sequencing. Said plasmid contains 370 bp of sequences upstream of ORF C6L (C6 left flanking arm), an early transcription stop

vaccinia signal, stop codons in the six reading frames, a multiple cloning site containing the SmaI, PstI, XhoI and EcoRI restriction sites and finally 1156 bp of sequences downstream of the ORF C6L (C6 right flanking arm).

- 5 Plasmid pMP1VC (Schmitt J. F. C. et al., J. Virol., 1988, 62, 1889-1897, Saito R. K. et al., Science, 1988, 239, 487-491) was used as the matrix for amplifying the complete sequence of the 13L vaccine promoter with the following oligonucleotides:

FC112 (33 mer) (SEQ ID NO :24):

5'AAACCCGGCGGTGGTTTGCGATTCCGAAATCT 3'

- 10 and FC113 (43 mer) (SEQ ID NO :25):

5'AAAAGAATTCGGATCCGATTAAACCTAAATAATTGTACTTTGT 3'

to amplify a 151 bp PCR fragment. This fragment was digested by the SmaI and EcoRI restriction enzymes in order to isolate, following agarose gel electrophoresis, an approximately 138 bp SmaI-EcoRI restriction fragment. This fragment was then ligated with plasmid pC6L previously digested by SmaI and EcoRI to

- 15 give the plasmid pFC113.

#### Example 16: Construction of recombinant viruses vCP1717 and vCP1718

A PCR reaction was performed using the plasmid pFC106 (example 8) as the matrix and the following

- 20 oligonucleotides:

FC114 (33 mer) (SEQ ID NO :26):

5'TTTCAGGTGATGTATAATGCTGATATGATTGAC 3'

and FC115 (42 mer) (SEQ ID NO :27):

5'TTTTGGATCCGCGGCCGCTTAACGTTTCCCGAGGCGAAGTC 3'

- 25 to amplify an approximately 2973 bp PCR fragment. This fragment was digested with the PmlI and BamHI restriction enzymes to isolate, following agarose gel electrophoresis, the approximately 2958 bp PmlI-BamHI restriction fragment (fragment F). Plasmid pFC113 (example 15) was digested by the PmlI and BamHI restriction enzymes to isolate, following agarose gel electrophoresis, the approximately 4500 bp PmlI-BamHI restriction fragment (fragment G). Fragments F and G were then ligated together to give the plasmid
- 30 pFC114.

Plasmid pFC114 was linearized by NotI, then transfected in primary chicken embryo cells infected with canarypox virus vCP1713 (example 11) according to the previously described calcium phosphate precipitation method (Panicali et Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982, 79, 4927-4931; Piccini et al. In Methods in Enzymology, 1987, 163, 545-563, publishers Wu R. and Grossman L. Academic Press). Positive plaques

35 were selected on the basis of a hybridization with a radioactively labelled probe specific to the nucleotide sequence of envelope glycoprotein E. These plaques underwent four successive plaque selection/purification cycles of the ranges until a pure population was isolated. A representative plaque corresponding to *in vitro* recombination between the donor plasmid pFC114 and the genome of the ALVAC

40 canarypox virus was then amplified and the recombinant virus stock obtained was designated vCP1717.

The NotI-linearized pFC114 plasmid was also used for transfecting primary chicken embryo cells infected with the vCP1712 canarypox virus (example 10) using the procedure described hereinbefore. The thus obtained recombinant virus stock was designated vCP1718.

#### Example 21: Production of recombinant vaccines

For the preparation of equine vaccines, the recombinant canarypox vCP1712 virus (example 10) is adjuvanted with carbomer solutions, namely Carbopol™974P manufactured by BF Goodrich, Ohio, USA (molecular weight about 3,000,000).

A 1.5% Carbopol™974P stock solution is initially prepared in distilled water containing 1 g/l of sodium chloride. This stock solution is then used for the preparation of a 4 mg/ml Carbopol™974P solution in physiological salt solution. The stock solution is mixed with the adequate volume of said physiological salt solution, either in a single stage or in several successive stages, the pH value being adjusted in each stage with a 1N sodium hydroxide solution (or even more concentrated) in order to obtain a final pH value of 7.3 to 7.4.

The ready-to-use Carbopol™974P solution obtained in this way is used for taking up recombinant, lyophilized viruses or for diluting concentrated, recombinant virus stock solutions. For example, to obtain a viral suspension containing  $10^8$  pfu/1 ml dose, a viral stock solution is diluted so as to obtain a titer of  $10^{8.3}$  pfu/ml, followed by dilution in equal parts with said ready-to-use 4 mg/ml Carbopol™974P solution.

Recombinant vaccines can also be produced with recombinant canarypox viruses vCP1713 (example 11) or vCP1717 (example 18) or vCP1718 (example 16) or a mixture of three canarypox viruses vCP1714 (example 12), vCP1715 (example 13) and vCP1716 (example 14) according to the procedure described hereinbefore.

#### Example 22: Production of DNA vaccines for equines

An DNA solution containing the plasmid pFC104 (example 6) is concentrated by ethanolic precipitation in the manner described by Sambrook et al (1989). The DNA sediment is taken up by a 0.9% NaCl solution so as to obtain a concentration of 1 mg/ml. A 0.75 mM DMRIE-DOPE solution is prepared by taking up a DMRIE-DOPE lyophilizate by a suitable sterile H<sub>2</sub>O volume.

The formation of plasmid-lipid DNA complexes is brought about by diluting in equal parts the 0.75 mM DMRIE-DOPE solution (1:1) with the 1 mg/ml DNA solution in 0.9% NaCl. The DNA solution is progressively introduced with the aid of a 26G crimped needle along the wall of the flask containing the cationic lipid solution so as to prevent the formation of foam. Gentle stirring takes place as soon as the two

solutions have mixed. Finally a composition comprising 0.375 mM of DMRIE-DOPE and 500 µg/ml plasmid is obtained.

It is desirable for all the solutions used to be at ambient temperature for all the operations described hereinbefore. DNA/DMRIE-DOPE complexing takes place at ambient temperature for 30 minutes before immunizing the animals.

DNA vaccines can also be produced with DNA solutions containing plasmids pFC104 (example 6) and pFC106 (example 8) or containing plasmids pFC105 (example 7) and pFC106, or containing plasmids pFC101, pFC102 and pFC103 (examples 3 to 5), or containing plasmid pFC105 according to the procedure described in the present example.

#### Example 23: *In vitro* expression tests

The expression of WN proteins is tested for each construction by conventional indirect immunofluorescence and Western Blot methods.

These tests are carried out on 96 well plates containing CHO cells cultured in monolayers and transfected by plasmids or containing GEF cells cultured in monolayers and infected by recombinant viruses.

The WN proteins are detected by the use of infected chicken or horse sera and of labelled anti-sera.

The size of the fragments obtained after migration on agarose gel is compared with those expected.

#### Example 24: Effectiveness on animals

The recombinant vaccines and plasmid vaccines are injected twice at approximately two week intervals into approximately seven day-old, unvaccinated SPF chickens by the intramuscular route and in a volume of approximately 0.1 ml. An unvaccinated control group is included in the study.

The chickens are challenged by subcutaneous administration into the neck of  $10^{5.4}$  TCID<sub>50</sub> of pathogenic WN virus.

Viremia, antibody response and mortality are observed. Autopsies are carried out to observe lesions.

#### Example 25: Titrating anti-WNV neutralizing antibodies

Dilution series are produced for each serum at a rate of 3 in DMEM medium to which is added 10% fetal calf serum in 96 well plates of the cellular culture type. To 0.05 ml of diluted serum is added 0.05 ml of culture

medium containing approximately 100 CCIP<sub>50</sub>/ml of WNV. This mixture is incubated for 2 hours at 37°C in an oven in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

0.15 ml of a suspension of VERO cells containing approximately 100,000 cells/ml is then added to each mixture. The cytopathic effect (CPE) is observed by phase contrast microscopy after 4 to 5 days culturing at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The neutralizing titers of each serum are calculated using the Kärber method. The titers are given in the form of the largest dilution inhibiting the cytopathic effect for 50% of the wells. The titers are expressed in log<sub>10</sub> VN<sub>50</sub>. Each serum is titrated at least twice and preferably four times.

It is to be understood that the invention defined by the appended claims is not to be limited to particular embodiments set forth in the above description, but encompasses the variations thereof which do not depart from the spirit or scope of the present invention.

## CLAIMS

1. Vaccine against the WN virus, particularly for the protection of equines, canines, felines, bovines, porcines and birds, comprising the structural protein E of the WN virus or a polynucleotide encoding said protein E, and a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient.

2. Vaccine according to claim 1, characterized in that it comprises an *in vivo* expression vector comprising a polynucleotide encoding the structural protein E of the WN virus, and the elements necessary for the expression of the polynucleotide in a host cell.

3. Vaccine according to claim 2, characterized in that the polynucleotide also encodes the premembrane protein prM and/or for the membrane protein M.

4. Vaccine according to claim 2, characterized in that the polynucleotide encodes prM-M-E.

5. Vaccine according to any one of the claims 1 to 4, characterized in that the polynucleotide also encodes a signal peptide.

6. Vaccine according to claim 5, characterized in that it is a signal peptide of the WN virus.

7. Vaccine according to claim 5, characterized in that it is a heterologous signal peptide.

8. Vaccine according to claim 7, characterized in that it is the signal peptide of the human tissue plasminogen activator.

9. Vaccine according to any one of the claims 2 to 8, characterized in that it comprises another polynucleotide encoding a protein of another WN virus strain and/or another pathogenic agent and/or for a cytokin.

10. Vaccine according to any one of the claims 2 to 9, characterized in that it comprises another expression vector incorporating another polynucleotide encoding a protein.

11. Vaccine according to claim 10, characterized in that said other vector has a polynucleotide encoding a protein of the WN virus chosen from among prM, and prM-M.

12. Vaccine according to claim 10, characterized in that the other expression vector comprises a polynucleotide encoding E of another WN virus strain.

13. Vaccine according to claim 10, forming a multivalent vaccine, characterized in that the other expression vector comprises a polynucleotide encoding an immunogen of another pathogenic agent.

14. Vaccine according to claim 10, characterized in that the other expression vector comprises a polynucleotide encoding a cytokin.

15. Vaccine according to any one of the claims 2 to 14, characterized in that the *in vivo* expression vector is a viral vector.

16. Vaccine according to claim 15, characterized in that the viral expression vector is a poxvirus, an adenovirus or a herpes virus.

17. Vaccine according to claim 16, characterized in that it is a poxvirus chosen from among the vaccinia virus, avipox viruses, particularly canarypox or fowpox, swinepox, raccoonpox and camelpox.

18. Vaccine according to claim 15, characterized in that the expression vector is an avian, canine, bovine, porcine or human adenovirus.

19. Vaccine according to claim 15, characterized in that the expression vector is a herpes virus chosen from among EHV-1, EHV-4, CHV, FHV, BHV, PRS, MDV, HVT and herpes virus of the duck.

20. Vaccine according to any one of the claims 2 to 15, characterized in that the *in vivo* expression vector is a plasmid incorporating the elements necessary for *in vivo* polynucleotide expression.

21. Vaccine according to any one of the claims 2 to 20, characterized in that it comprises an adjuvant.



22. Vaccine according to claim 21, characterized in that the adjuvant is chosen from among (1) the polymers of acrylic or methacrylic acid and polymers of maleic anhydride and alkenyl derivative, (2) immunostimulating sequences, (3) an oil-in-water emulsion, (4) cationic lipids containing a quaternary ammonium salt and (5) cytokins.

5

23. Vaccine according to claim 22, characterized in that the vector or vectors are viral vectors and that the adjuvant is a polymer of acrylic or methacrylic acid or a polymer of maleic anhydride and alkenyl derivative.

10

24. Vaccine according to claim 23, characterized in that the adjuvant is a carbomer.

25. Vaccine according to claim 22, characterized in that the expression vector or vectors are plasmids and in that the adjuvant is a cationic lipid containing a quaternary ammonium salt.

15

26. Vaccine according to claim 25, characterized in that the cationic lipid containing a quaternary ammonium salt comprises DMRIE, preferably associated with a neutral lipid.

27. Vaccine according to claim 26, characterized in that the adjuvant is DMRIE-DOPE.

20

28. Vaccine according to claim 9, 14 or 22, characterized in that the cytokin is an equine cytokin or an avian cytokin.

29. Vaccine according to claim 28, characterized in that the cytokin is chosen from among interleukin 18, interleukin 12, interleukin 15, MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF.

25

30. Vaccine according to claim 28, characterized in that the cytokin is chosen from among the avian interleukins cIL-18, cIL-15.

31. Vaccine according to claim 28, characterized in that the cytokin is equine GM-CSF.

30

32. Vaccine according to claim 1, comprising the structural protein E of the WN virus and a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient, optionally the premembrane protein prM and/or the membrane protein M and an adjuvant.

35

33. Vaccine according to claim 32, characterized in that the adjuvant is chosen from among (1) polymer of acrylic or methacrylic acid or polymer of maleic anhydride and alkenyl derivative, (2) immunostimulating sequence, (3) oil-in-water emulsion, (4) water-in-oil emulsion, (5) saponin or (6) alumina hydroxide.

40

34. Vaccine according to any one of the claims 1 to 33, forming a multivalent vaccine, characterized in that it comprises a vaccine component against another pathogenic agent.

35. Vaccine according to claim 34, characterized in that the component against another pathogenic agent incorporates an immunogen in the form of subunits, inactivated agent or attenuated agent, or an expression vector encoding an immunogen of said other pathogenic agent.

36. Vaccine according to claim 34 or 35, characterized in that it comprises a vaccine component against the equine rhinopneumonia virus, against the equine influenza virus, against the Eastern encephalitis virus, against the Western encephalitis virus, against the Venezuelan encephalitis virus, against *Clostridium tetani*, and mixtures thereof.

37. Vaccine according to claim 34 or 35, characterized in that it comprises a vaccine component against the Marek's disease virus, against the Newcastle disease virus, against the Gumboro disease virus, against the infectious bronchitis virus, against the infectious anemia virus, against the infectious laryngotracheitis virus, against the encephalomyelitis virus, against the hemorrhagic enteritis virus, against the pneumovirus virus, against the fowl plague virus, against the chicken hydropericarditis virus, against avian reoviruses, against *Escherichia coli*, against *Mycoplasma gallinarum*, against *Mycoplasma gallisepticum*, against *Haemophilus avium*, against *Pasteurella gallinarum*, against *Pasteurella multocida gallicida*, and mixtures thereof.

38. *In vivo* or *in vitro* expression vector incorporating as the sole WN virus polynucleotide, a polynucleotide encoding protein E and optionally a signal peptide of the WN virus, and the elements necessary for the expression of the polynucleotide.

39. *In vivo* or *in vitro* expression vector, incorporating as the sole WN virus polynucleotide, a polynucleotide encoding protein E and for prM and/or M, and optionally a signal peptide of the WN virus, and the elements necessary for the expression of the polynucleotide.

40. *In vivo* or *in vitro* expression vector, incorporating as the sole polynucleotide of the WN virus, a polynucleotide encoding prM-M-E and optionally a signal peptide of the WN virus, and the elements necessary for the expression of the polynucleotide.

41. Plasmid incorporating a polynucleotide encoding protein E and the elements necessary for *in vivo* polynucleotide expression.

42. Herpes vector, preferably HVT or EHV, incorporating a polynucleotide encoding protein E and the elements necessary for *in vivo* polynucleotide expression.

43. Pox vector chosen from among avipox, swinepox, raccoonpox and carnelpox, preferably canarypox or fowlpox, incorporating a polynucleotide encoding protein E and the elements necessary for *in vivo* polynucleotide expression.

44. Adenovirus vector incorporating a polynucleotide encoding protein E and the elements necessary for *in vivo* polynucleotide expression.

- 5 45. Plasmid or vector according to one of the claims 38 to 44, characterized in that the polynucleotide encodes pM-M-E.

TITLE OF THE INVENTION

## THE VACCINE AGAINST WEST NILE VIRUS

RELATED APPLICATIONS/PATENTS & INCORPORATION BY REFERENCE

Reference is made herein to French Patent Application Serial No. \_\_\_\_\_, filed on \_\_\_\_\_.

Each of the applications and patents cited in this text, as well as each document or reference cited in each of the applications and patents (including during the prosecution of each issued patent; "application cited documents"); and each of the PCT and foreign applications or patents corresponding to and/or claiming priority from any of these applications and patents, and each of the documents cited or referenced in each of the application cited documents, are hereby expressly incorporated herein by reference. More generally, documents or references are cited in this text, either in a Reference List before the claims, or in the text itself; and, each of these documents or references ("herein-cited references"), as well as each document or reference cited in each of the herein-cited references (including any manufacturer's specifications, instructions, etc.), is hereby expressly incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to immunogenic compositions that are useful for inducing an immunogenic response in a subject. The present invention further relates to administration of the immunogenic compositions to wild animals, to induce in the animals an immunogenic response that is protective against West Nile virus. The present invention further relates to oral administration of the immunogenic compositions to the wild animals. Oral administration, such in bait, comprises an efficient means of immunization in the wild. Following oral administration, the health of the wild animals is improved and overall incidence of the infection in the population is decreased, or eradicated. Wild animals receiving immunization can advantageously transfer neutralizing antibodies from their blood into a mosquito carrier, eradicating infectious virus from the carrier. Thus, immunization of wild animals can decrease transmission of the disease. Other aspects of the invention are described in or are obvious from the following disclosure (and within the ambit of the invention).

La présente invention a pour objet des vecteurs d'expression *in vivo* et *in vitro* comprenant et exprimant au moins un polynucléotide du virus de la fièvre du Nil, ainsi que des compositions immunogènes et des vaccins contre la fièvre du Nil. Elle a encore pour objet des méthodes d'immunisation et de vaccination  
5 contre ce virus.

Le virus de la fièvre du Nil (West Nile Virus ou WNV) fut identifié pour la première fois en 1937 chez l'homme en Ouganda dans la province de West Nile (Zeller H. G., *Med. Trop.*, 1999, 59, 490-494).

Largement répandu en Afrique, et aussi rencontré en Inde, au Pakistan et  
10 dans le bassin méditerranéen, il a été identifié aux USA pour la première fois dans la ville de New York en 1999 (Anderson J. F. *et al.*, *Science*, 1999, 286, 2331-2333).

Le virus de la fièvre du Nil touche aussi bien les oiseaux que les mammifères et l'homme.

15 La maladie se caractérise chez les oiseaux par une attaque du système nerveux central et la mort. Les lésions incluent des encéphalites, des hémorragies dans le myocarde et des hémorragies et nécroses dans le tractus intestinal.

Chez les poulets, des infections expérimentales par inoculations sous-cutanées de virus de la fièvre du Nil isolés sur des corneilles ont entraîné des  
20 nécroses du myocarde, des néphrites et des pneumonies de 5 à 10 jours après inoculation, des encéphalites modérées à sévères, 21 jours après inoculation (Serine D. A. *et al.*, *Avian Disease*, 2000, 44, 642-649).

Le virus de la fièvre du Nil touche aussi les chevaux, notamment en Afrique du Nord et en Europe (Cantile C. *et al.*, *Equine Vet. J.*, 2000, 32(1), 31-35). Ces  
25 chevaux montrent des signes d'ataxie, de faiblesse des membres postérieurs, de parésie évoluant vers une tétraplégie et la mort. Les chevaux et les camélidés sont les principaux animaux manifestant des signes cliniques sous forme d'encéphalites.

Des anticorps anti-WNV ont été détectés chez certains rongeurs, chez le  
30 bétail, notamment chez des bovins et des ovins, chez des animaux domestiques, notamment chez le chien (Zeller H. G., *Med. Trop.*, 1999, 59, 490-494 ; Lundstrom J. O., *Journal of Vector Ecology*, 1999, 24(1), 1-39).

L'espèce humaine n'est pas épargnée par le virus de la fièvre du Nil, avec de nombreux symptômes (Sampson B. A., Human Pathology, 2000, 31(5), 527-531 ; Marra C. M., Seminars in Neurology, 2000, 20(3), 323-327).

Le virus de la fièvre du Nil est transmis aux oiseaux et aux mammifères par piqûres de certains moustiques (par exemple *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*) et de tiques.

Les oiseaux sauvages et domestiques sont un réservoir pour le virus de la fièvre du Nil et un vecteur de propagation par leurs migrations.

Les virions du virus de la fièvre du Nil sont des particules sphériques de 50 nm de diamètre constituées d'une enveloppe lipoprotéique entourant une nucléocapside icosahédrique contenant un ARN simple brin de polarité positive.

Un unique cadre ouvert de lecture (COL) code pour l'ensemble des protéines virales sous la forme d'une polyprotéine. Le clivage et la maturation de cette polyprotéine conduit à la production d'une dizaine de protéines virales différentes. Les protéines structurales sont codées par la partie 5' du génome et correspondent à la nucléocapside nommée C (14 kDa), la glycoprotéine d'enveloppe nommée E (50 kDa), la protéine de pré-membrane nommée prM (23 kDa), la protéine de membrane nommée M (7 kDa). Les protéines non structurales sont codées par la partie 3' du génome et correspondent aux protéines NS1 (40 kDa), NS2A (19 kDa), NS2B (14 kDa), NS3 (74 kDa), NS4A (15 kDa), NS4B (29 kDa), NS5 (97 kDa).

Parrish C. R. *et al.* (J. Gen. Virol., 1991, 72, 1645-1653) et Kulkarni A. B. *et al.* (J. Virol., 1992, 66(6), 3583-3592) ont construit, à partir du virus de la vaccine, des vecteurs d'expression *in vivo* contenant divers inserts correspondant à des séquences nucléotidiques codant pour des protéines structurales et/ou non-structurales du virus Kunjin. Ces vecteurs ont été administrés à la souris pour évaluer la réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire. Les résultats obtenus ne permettent pas de mettre en évidence quelle serait une bonne stratégie de vaccination contre la fièvre du Nil.

La présente invention a pour objectif de proposer un moyen de prévention et/ou de lutte contre les maladies causées par le virus WN.

Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel moyen qui puisse être employé chez les différentes espèces animales sensibles à la maladie causée par ce virus et, en particulier, les espèces équines et aviaires.

Un autre objectif encore de l'invention est de proposer des méthodes d'immunisation et de vaccination des espèces cibles.

Un autre objectif de l'invention est de proposer de tels moyens et méthodes permettant d'assurer un diagnostic différentiel.

Ainsi, l'invention a pour premier objet les vecteurs d'expression *in vitro* et/ou *in vivo* comprenant un polynucléotide codant pour la protéine d'enveloppe E du virus WN. Ces vecteurs comprennent en plus les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide dans la cellule hôte.

En plus du polynucléotide codant pour E, les vecteurs d'expression selon l'invention peuvent comprendre un ou plusieurs autres polynucléotides codant pour d'autres protéines du virus WN, de préférence des protéines structurales du virus WN, ces séquences étant de préférence choisies parmi celles codant pour la protéine de pré-membrane prM et pour la protéine de membrane M.

Le vecteur comprend de préférence un polynucléotide formant une seule phase codante correspondant e.g. à prM-E, M-E et plus particulièrement à prM-M-E. Un vecteur comprenant plusieurs polynucléotides séparés codant pour les différentes protéines (e.g. prM et/ou M et E) entre aussi dans le cadre de la présente invention. Le vecteur, en particulier *in vivo*, peut aussi comprendre des polynucléotides correspondant à plus d'une souche de virus WN, en particulier deux ou plus polynucléotides codant pour E ou pour prM-M-E de souches différentes. Comme on le verra plus loin, le vecteur, en particulier *in vivo*, peut aussi comprendre une ou des séquences nucléotidiques codant pour des immunogènes d'autres agents pathogènes et/ou pour des cytokines.

Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, le vecteur d'expression comprend un polynucléotide codant pour prM-M-E en une seule phase de lecture.

Par polynucléotide codant pour une protéine du virus WN, on entend principalement un fragment d'ADN qui code pour cette protéine, ou le brin complémentaire de ce fragment d'ADN. Un ARN n'est pas exclu.



Au sens de l'invention, le terme protéine englobe les fragments, y compris peptides et polypeptides. Par définition, le fragment de protéine est immunologiquement actif en ce sens qu'une fois administré à l'hôte, il est susceptible de déclencher une réponse immunitaire de type humorale et/ou cellulaire dirigée contre la protéine. De préférence, le fragment de protéine est tel qu'il possède substantiellement la même activité immunologique que la protéine entière. Un fragment de protéine selon l'invention comprend donc au moins un épitope ou déterminant antigénique. Le terme épitope se rapporte à un site de la protéine capable d'induire une réaction immunitaire de type humorale (cellules B) et/ou de type cellulaire (cellules T).

La structure minimale du polynucléotide est donc celle qui code pour un épitope ou déterminant antigénique de la protéine considérée. Un polynucléotide codant pour un fragment de la protéine totale comprend notamment au minimum 21 nucléotides, notamment au moins 42 nucléotides et de préférence au moins 57, 87 ou 150 nucléotides consécutifs de la séquence dont il est issu. Les techniques de détermination des épitopes sont bien connues de l'homme du métier, on peut notamment utiliser les banques de peptides chevauchants (Hemmer B. *et al.*, Immunology Today, 1998, 19(4), 163-168), Pepscan (Geysen H. M. *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, 81(13), 3998-4002 ; Geysen H. M. *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, 82(1), 178-182 ; Van der Zee R. *et al.*, Eur. J. Immunol., 1989, 19(1), 43-47 ; Geysen H. M., Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 1990, 21(4), 523-533 ; Multipin® Peptide Synthesis Kits de Chiron), les algorithmes (De Groot A. *et al.*, Nature Biotechnology, 1999, 17, 533-561).

En particulier les polynucléotides selon l'invention comprennent la séquence nucléotidique codant pour l'un ou les deux domaines transmembranaires, de préférence les deux, situés en partie C terminale de la protéine E. Pour la souche WNV NY99 ces domaines correspondent aux séquences en acides aminés 742 à 766 et 770 à 791 de GenBank AF196835.

Des éléments nécessaires à l'expression du ou des polynucléotides sont présents. Il s'agit a minima d'un codon d'initiation (ATG), d'un codon stop et d'un promoteur, ainsi qu'une séquence de polyadénylation pour les plasmides et les vecteurs viraux autres que poxvirus. Lorsque le polynucléotide code pour un

fragment de la polyprotéine, par exemple prM-E, M-E, prM-M-E, un ATG est placé en 5' de la phase de lecture et un codon stop est placé en 3'. Comme il sera expliqué plus loin, d'autres éléments, permettant le contrôle de l'expression, pourront être présents, tels que séquences activatrices (en anglais « enhancer »),  
 5 séquences stabilisatrices, séquences signal permettant la sécrétion de la protéine.

La présente invention a aussi pour objet des préparations comprenant de tels vecteurs d'expression. Plus particulièrement, elle concerne des préparations comprenant un ou plusieurs vecteurs d'expression *in vivo*, comprenant et exprimant un ou plusieurs des polynucléotides ci-dessus, dont celui codant pour  
 10 E, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

Suivant une première modalité de l'invention, le ou les autres vecteurs dans la préparation comprennent et expriment une ou plusieurs autres protéines du virus WN, e.g. prM, M, prM-M.

Suivant une autre modalité, le ou les autres vecteurs dans la préparation  
 15 comprennent et expriment une ou plusieurs protéines d'une ou plusieurs autres souches de virus WN. Notamment, la préparation comprend au moins deux vecteurs exprimant, en particulier *in vivo*, des polynucléotides de souches WN différentes, codant pour les mêmes protéines et/ou pour des protéines différentes, de préférence pour les mêmes protéines. Il s'agit de préférence de vecteurs  
 20 exprimant *in vivo* E ou prM-M-E de deux, trois ou plus souches WN différentes. L'invention vise aussi les mélanges de vecteurs exprimant prM, M, E, prM-M, prM-E ou M-E de souches différentes.

Suivant une autre modalité encore, et comme on le verra plus en détail plus loin, le ou les autres vecteurs dans la préparation comprennent et expriment une  
 25 ou plusieurs cytokines et/ou un ou plusieurs immunogènes d'un ou plusieurs autres agents pathogènes.

L'invention vise aussi les diverses combinaisons de ces différentes modalités.

Les préparations comprenant un vecteur d'expression *in vitro* ou *in vivo*  
 30 comprenant et exprimant un polynucléotide codant pour prM-M-E constituent un mode de réalisation préféré de l'invention.

Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, les vecteurs d'expression *in vivo* ou *in vitro* comprennent comme seul(s) polynucléotide(s) du virus WN, un polynucléotide codant pour la protéine E, éventuellement associé à prM et/ou M, de préférence codant pour prM-M-E, et éventuellement une  
 5 séquence signal du virus WN.

Suivant un mode de réalisation particulier, une ou plusieurs des protéines non structurales NS2A, NS2B et NS3 sont exprimées conjointement aux protéines structurales selon l'invention, soit via le même vecteur d'expression, soit via un vecteur d'expression propre. Elles sont de préférence exprimées ensemble à partir  
 10 d'un polynucléotide unique.

L'invention a donc aussi pour objet un vecteur d'expression, *in vivo* ou *in vitro*, comprenant le polynucléotide codant pour NS2A, NS2B, NS3, leurs combinaisons, et de préférence pour NS2A-NS2B-NS3. A la base, ce vecteur peut être l'un des vecteurs décrits ci-dessus, comprenant un polynucléotide codant  
 15 pour une ou des protéines structurales, notamment E ou prM-M-E. En variante, l'invention concerne une préparation telle que décrite ci-dessus, comportant en outre au moins un de ces vecteurs exprimant une protéine non structurale et éventuellement un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

Pour réaliser les vecteurs d'expression selon l'invention l'homme du métier dispose de différentes souches du virus WN et de la description de la séquence  
 20 nucléotidique de leur génome. Voir notamment Savage H. M. *et al.* (Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999, 61(4), 600-611), tableau 2, qui mentionne 24 souches de virus WN et donne les références d'accès à des séquences polynucléotidiques dans GenBank.

On peut par exemple se référer à la souche NY99 (GenBank AF196835). Dans GenBank, il est précisé pour chaque protéine la séquence d'ADN correspondante (nucléotides 466-741 pour prM, 742-966 pour M, 967-2469 pour  
 25 E, soit 466-2469 pour prM-M-E, 3526-4218 pour NS2A, 4219-4611 pour NS2B et 4612-6468 pour NS3, soit 3526-6468 pour NS2A-NS2B-NS3). Par comparaison et  
 30 alignement de séquences, la détermination d'un polynucléotide codant pour telle protéine dans une autre souche de WNV est immédiate.

Il a été indiqué plus haut que par polynucléotide, on entendait la séquence codant pour la protéine ou un fragment ou un épitope, spécifique du virus WN. En outre, par équivalence, le terme polynucléotide englobe aussi les séquences nucléotidiques correspondantes des différentes souches de virus WN et les séquences nucléotidiques qui diffèrent par la dégénérescence du code.

Au sein de la famille des virus WN, l'identité entre séquences en acides aminés prM-M-E par rapport à celle de NY99 est égale ou supérieure à 90 %. Sont donc comprises dans l'invention les polynucléotides codant pour une séquence d'acides aminés dont l'identité avec la séquence en acides aminés native est supérieure ou égale à 90 %, notamment à 92 %, de préférence à 95 %, et plus particulièrement encore 98 %. Seront aussi considérés comme des équivalents les fragments de ces polynucléotides homologues, qui sont spécifiques des virus WN.

Ainsi, si l'on parle d'un polynucléotide du virus WN, ce terme englobe les séquences équivalentes au sens de l'invention.

On a vu aussi que le terme protéine englobe les polypeptides et peptides immunologiquement actifs. Pour les besoins de l'invention, ceci englobe :

- a) les protéines correspondantes des différentes souches de virus WN ;
- b) les protéines qui en diffèrent mais qui conservent avec une protéine native WN une identité supérieure ou égale à 90 %, notamment à 92 %, de préférence à 95 %, et plus particulièrement encore 98 %.

Ainsi, si l'on parle d'une protéine du virus WN, ce terme englobe les protéines équivalentes au sens de l'invention.

Différentes souches de virus WN sont accessibles auprès de collections, notamment auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC), par exemple sous les numéros d'accès VR-82 ou VR-1267. Le virus dénommé Kunjin est considéré comme étant en fait un virus WN.

Conformément à l'invention on préfère que le polynucléotide comprenne en plus une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal, situé en amont de la protéine exprimée pour en assurer la sécrétion. Il peut donc s'agir d'une séquence endogène, c'est-à-dire de la séquence signal naturelle lorsqu'elle existe (provenant du même virus WN ou d'une autre souche). Par exemple, pour le virus

WN NY99, la séquence signal endogène de E correspond aux nucléotides 922 à 966 de la séquence GenBank ; pour prM il s'agit des nucléotides 421 à 465. Il peut aussi s'agir d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal hétérologue, notamment celle codant pour le peptide signal de l'activateur tissulaire du plasminogène humain (tPA) (Hartikka J. *et al.*, Human Gene Therapy, 1996, 7, 1205-1217). La séquence nucléotidique codant pour le peptide signal est insérée en phase et en amont de la séquence codant pour E ou ses combinaisons, e.g. prM-M-E.

Suivant une première modalité de l'invention, les vecteurs d'expression *in vivo* sont des vecteurs viraux.

Ces vecteurs d'expression sont avantageusement des poxvirus, par exemple le virus de la vaccine, les avipox (en particulier canarypox, fowlpox), le swinepox, le raccoonpox et le camelpox, des adénovirus, tels que les adénovirus aviaires, canins, porcins, bovins, humains, et des herpèsvirus, tels que les virus herpès équins (EHV sérotypes 1 et 4), le virus herpès canin (CHV), le virus herpès félin (FHV), les virus herpès bovins (BHV sérotypes 1 et 4), le virus herpès porcin (PRV), les virus de la maladie de Marek (MDV sérotypes 1 et 2), le virus herpès de la dinde (HVT ou MDV sérotype 3), le virus herpès du canard. Pour la vaccination de l'espèce aviaire le vecteur HVT est préféré, et pour la vaccination des chevaux on préfère le vecteur EHV.

Pour les poxvirus, l'homme du métier peut se reporter à WO-A-90/12882, et plus particulièrement pour le virus de la vaccine à US-A-4,769,330 ; US-A-4,722,848 ; US-A-4,603,112 ; US-A-5,110,587 ; US-A-5,494,807 ; US-A-5,762,938 ; pour le fowlpox à US-A-5,174,993 ; US-A-5,505,941 ; US-5,766,599 ; pour le canarypox à US-A-5,756,103 ; pour le swinepox à US-A-5,382,425 ; pour le raccoonpox à WO-A2-00/03030.

Lorsque le vecteur d'expression est un virus de la vaccine, les sites d'insertion du (des) polynucléotide(s) à exprimer sont en particulier le gène de la thymidine kinase (TK), le gène de l'hémagglutinine (HA), la région du corps d'inclusion de type A (ATI). Lorsqu'il s'agit d'un canarypox, les sites d'insertion sont en particulier situés dans, ou constitués par, les COLs C3, C5 et C6. Lorsqu'il

US-A-5,304,773

s'agit d'un fowlpox, les sites d'insertion sont en particulier situés dans, ou constitués par, les COLs F7 et F8.

Selon l'un des modes préférés de l'invention, le vecteur d'expression poxvirus est un ALVAC ou un virus canarypox (par exemple de la souche Rentschler) qui a été atténué, notamment par plus de 200 passages sur cellules de fibroblastes d'embryons de poulet (CEF). Un virus canarypox de souche ALVAC a été déposé le 14 novembre 1996 auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro d'accès VR-2547. D'autres poxvirus atténués peuvent être utilisés, notamment des fowlpox atténués (e.g. TROVAC) ou des virus de la vaccine atténués (e.g. NYVAC). Sur les poxvirus TROVAC et NYVAC, l'homme de l'art peut se reporter au brevet WO-A-96/40241.

De préférence, lorsque le vecteur d'expression est un poxvirus, le polynucléotide à exprimer est inséré sous le contrôle d'un promoteur spécifique des poxvirus, notamment le promoteur vaccine 7,5 kDa (Cochran *et al.*, J. Virology, 1985, 54, 30-35), le promoteur vaccine I3L (Riviere *et al.*, J. Virology, 1992, 66, 3424-3434), le promoteur vaccine HA (Shida, Virology, 1986, 150, 451-457), le promoteur cowpox ATI (Funahashi *et al.*, J. Gen. Virol., 1988, 69, 35-47), ou encore le promoteur vaccine H6 (Taylor J. *et al.* Vaccine, 1988, 6, 504-508 ; Guo P. *et al.* J. Virol., 1989, 63, 4189-4198 ; Perkus M. *et al.* J. Virol., 1989, 63, 3829-3836).

Lorsque le vecteur d'expression est un virus herpès HVT, des sites d'insertion appropriés sont en particulier localisés dans le fragment BamHI I ou dans le fragment BamHI M de HVT. Le fragment de restriction de BamHI I de HVT comprend plusieurs cadres ouverts de lecture (COLs) et trois régions intergéniques et comprend plusieurs zones préférées d'insertion, à savoir les trois régions intergéniques 1, 2 et 3, qui sont les régions préférées, et le COL UL55 (FR-A-2 728 795, US-A-5 980 906). Le fragment de restriction BamHI M de HVT comprend le COL UL43 qui est aussi un site préféré d'insertion (FR-A-2 728 794, US-A-5 733 554).

Lorsque le vecteur d'expression est un virus herpès EHV-1 ou EHV-4, des sites d'insertion appropriés sont en particulier TK, UL43 et UL45 (EP-A-0668355).

De préférence, lorsque le vecteur d'expression est un virus herpès, le polynucléotide à exprimer est inséré sous le contrôle d'un promoteur eucaryote fort, de préférence le promoteur CMV-IE. Ces promoteurs forts sont décrits ci-après dans la partie de la description relative aux plasmides.

5 Suivant une deuxième modalité de l'invention, les vecteurs d'expression *in vivo* sont des vecteurs plasmidiques appelés plasmides.

Le terme plasmide entend recouvrir toute unité de transcription ADN sous forme d'une séquence polynucléotidique comprenant un polynucléotide selon l'invention et les éléments nécessaires à son expression *in vivo*. On préfère la  
10 forme plasmide circulaire, superenroulée ou non. La forme linéaire entre également dans le cadre de cette invention.

Chaque plasmide comprend un promoteur apte à assurer, dans les cellules hôtes, l'expression du polynucléotide inséré sous sa dépendance. Il s'agit en général d'un promoteur eucaryote fort. Le promoteur eucaryote fort préféré est le  
15 promoteur précoce du cytomégalo virus (CMV-IE), d'origine humaine ou murine, ou encore éventuellement d'une autre origine telle que rat, cobaye. Le promoteur CMV-IE peut comprendre la partie promoteur proprement dite, associée ou non à la partie activatrice (enhancer). On peut se référer à EP-A-260 148, EP-A-323 597, US-A-5 168 062, US-A-5 385 839, US-A-4 988 615, WO-A-87/03905. On  
20 préfère le CMV-IE humain (Boshart M. *et al.*, Cell., 1985, 41, 521-530) ou murin.

De manière plus générale, le promoteur est soit d'origine virale, soit d'origine cellulaire. Comme promoteur viral fort autre que CMV-IE, on peut citer le promoteur précoce/tardif du virus SV40 ou le promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous. Comme promoteur cellulaire fort, on peut citer le promoteur d'un gène du  
25 cytosquelette, tel que par exemple le promoteur de la desmine (Kwissa M. *et al.*, Vaccine, 2000, 18(22), 2337-2344), ou encore le promoteur de l'actine (Miyazaki J. *et al.*, Gene, 1989, 79(2), 269-277).

Par équivalence, les sous-fragments de ces promoteurs, conservant une activité promotrice adéquate sont compris dans la présente invention : e.g. les  
30 promoteurs CMV-IE tronqués selon WO-A-98/00168. La notion de promoteur selon l'invention inclut donc les dérivés et sous-fragments conservant une activité promotrice adéquate, de préférence substantiellement similaire à celle du



promoteur proprement dit dont ils sont issus. Pour le CMV-IE, cette notion comprend la partie promoteur proprement dite et/ou la partie activatrice et les dérivés et sous-fragments.

De préférence les plasmides comprennent d'autres éléments de contrôle de l'expression. En particulier, il est avantageux d'incorporer des séquences stabilisatrices du type Intron, de préférence intron II du gène de la  $\beta$ -globine de lapin (van Ooyen *et al.* Science, 1979, 206: 337-344).

Comme signal de polyadénylation (polyA) pour les plasmides et les vecteurs viraux autres que poxvirus, on peut utiliser notamment celui du gène de l'hormone de croissance bovine (bGH) (US-A-5 122 458), celui du gène de la  $\beta$ -globine du lapin ou celui du virus SV40.

Les autres éléments de contrôle de l'expression utilisables dans des plasmides peuvent également l'être dans des vecteurs d'expression virus herpès.

Suivant une autre modalité de l'invention, les vecteurs d'expression sont des vecteurs d'expression utilisés pour exprimer *in vitro* les protéines dans un système cellulaire approprié. Les protéines peuvent être ensuite récoltées dans le surnageant de culture, après sécrétion ou non (s'il n'y a pas sécrétion, on procède à une lyse cellulaire), éventuellement concentrées par des techniques classiques de concentration, notamment par ultrafiltration et/ou purifiées par des moyens de purification classiques, notamment les techniques de chromatographie de type affinité, échange d'ion, ou gel-filtration.

La production est effectuée par transfection de cellules de mammifère par des plasmides, par réplication de vecteurs viraux sur cellules de mammifère ou cellules aviaires, ou par réplication de Baculovirus (US-A-4 745 051 ; Vialard J. *et al.*, J. Virol., 1990, 64(1), 37-50 ; Verne A., Virology, 1988, 167, 56-71), e.g. Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus AcNPV, sur cellules d'insectes (par exemple cellules Sf9 *Spodoptera frugiperda*, dépôt ATCC CRL 1711). Comme cellules de mammifères on peut utiliser notamment des cellules de hamster (par exemple CHO ou BHK-21), des cellules de singe (par exemple COS ou VERO). L'invention couvre donc également ces vecteurs d'expression incorporant un polynucléotide selon l'invention, les protéines de WN ou fragments ainsi produits et les préparations les contenant.

La présente invention a donc aussi pour objet les préparations purifiées et/ou concentrées de protéines WN. Lorsque le polynucléotide code pour plusieurs protéines celles-ci sont clivées, et les préparations ci-dessus contiennent alors des protéines clivées.

5 L'invention a également pour objet les compositions immunogènes et les vaccins contre le virus WN comprenant au moins un vecteur d'expression *in vivo* selon l'invention et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant.

La notion de composition immunogène recouvre toute composition susceptible, une fois administrée à l'espèce cible, d'induire une réponse immunitaire dirigée contre le virus WN. Par vaccin, on entend une composition capable d'induire une protection efficace. Les espèces cibles sont principalement les équidés, les canidés, les félidés, les bovidés, les suidés, les oiseaux, de préférence le cheval, le chien, le chat, le porc, et pour les oiseaux, les oies, les dindes, les poulets, les canards ce qui par définition englobe les animaux reproducteurs, les pondeuses, les animaux de chair.

Les véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables sont parfaitement connus de l'homme du métier. A titre d'exemple, il peut s'agir de solution saline NaCl à 0,9% ou de tampon phosphate. Les véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables englobent aussi tout composé ou combinaison de composés permettant la facilitation de l'administration du vecteur, notamment de la transfection, et/ou l'amélioration de la conservation.

Les doses et volumes de dose sont définis plus loin dans le cadre de la description générale des méthodes d'immunisation et de vaccination.

25 Les compositions immunogènes et les vaccins selon l'invention comprennent de préférence un ou plusieurs adjuvants, choisis notamment parmi les adjuvants usuels. Conviennent particulièrement bien dans le cadre de la présente invention : (1) polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique, polymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, (2) séquences immunostimulatrices (ISS), notamment séquences oligodésoxyribonucléotidiques ayant un ou plusieurs motifs CpG non méthylés (Klinman D. M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2879-2883 ; WO-A1-98/16247), (3) une émulsion huile-

dans l'eau, en particulier l'émulsion SPT décrite à la page 147 de « Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach » edited by M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, et l'émulsion MF59 décrite à la page 183 du même ouvrage.

(4) lipides cationiques contenant un sel d'ammonium quaternaire; (5) cytokines, ou  
5 (6) leurs combinaisons ou mélanges.

L'émulsion huile-dans-l'eau (3), qui est particulièrement adaptée pour les vecteurs viraux, peut notamment être à base :

- d'huile de paraffine liquide légère (type Pharmacopée européenne) ;
- d'huile isoprénolde telle que le squalane, le squalène ;
- 10 - d'huile résultant de l'oligomérisation d'alcènes, en particulier d'isobutène ou de decène ;
- d'esters d'acides ou d'alcools à groupement alkyle linéaire ;
- plus particulièrement huiles végétales, oléate d'éthyle, di(caprylate / caprate) de propylène glycol, tri(caprylate / caprate) de glycérol, dioléate de  
15 propylène glycol ;
- d'esters d'acides ou d'alcools gras ramifiés, en particulier esters de l'acide isostéarique.

L'huile est utilisée en association avec des émulsifiants pour former l'émulsion. Les émulsifiants sont de préférence des tensio-actifs non ioniques, en  
20 particulier :

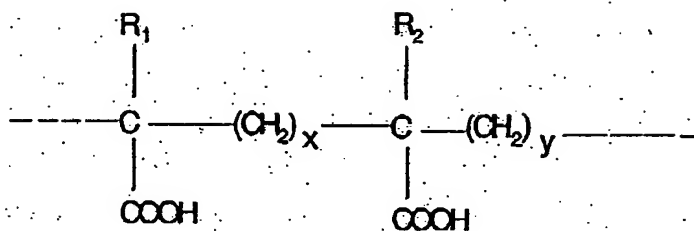
- les esters d'une part de sorbitan, de mannide (e.g. oléate d'anhydromannitol), de glycérol, de polyglycérol, ou de propylène glycol et d'autre part d'acide oléique, isostéarique, ricinoléique, hydroxystéarique, ces esters étant éventuellement éthoxylés,
- 25 - les blocs copolymères polyoxypropylène-polyoxyéthylène, en particulier les Pluronic®, notamment L121.

Parmi les polymères adjuvants de type (1), on préfère les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique réticulés, notamment réticulés par des éthers polyalcényliques de sucres ou de polyalcools. Ces composés sont connus sous le  
30 terme carbomère (Pharmeuropa vol. 8, n° 2, juin 1996). L'homme de l'art peut aussi se référer à US-A-2 909 462 qui décrit de tels polymères acryliques réticulés par un composé polyhydroxylé ayant au moins 3 groupes hydroxyle, de

préférence pas plus de 8, les atomes d'hydrogène d'au moins trois hydroxyles étant remplacés par des radicaux aliphatiques insaturés ayant au moins 2 atomes de carbone. Les radicaux préférés sont ceux contenant de 2 à 4 atomes de carbone, e.g. vinyles, allyles et autres groupes éthyléniquement insaturés. Les radicaux insaturés peuvent eux-mêmes contenir d'autres substituants, tels que méthyl. Les produits vendus sous la dénomination Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, USA) sont particulièrement appropriés. Ils sont notamment réticulés par un allyl saccharose ou par de l'allylpentaérythritol. Parmi eux, on peut citer en particulier les Carbopol® 974P, 934P et 971P.

Parmi les copolymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, on préfère les EMA® (Monsanto) qui sont des copolymères d'anhydride maléique et d'éthylène, linéaires ou réticulés, par exemple réticulés par du divinyléther. On peut se référer à J. Fields *et al.*, Nature, 186: 778-780, 4 juin 1960.

Sur le plan de leur structure, les polymères d'acide acrylique ou méthacrylique et les EMA® sont formés de préférence de motifs de base de formule suivante :



dans laquelle :

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, identiques ou différents, représentent H ou CH<sub>3</sub>

- x = 0 ou 1, de préférence x = 1

- y = 1 ou 2, avec x + y = 2

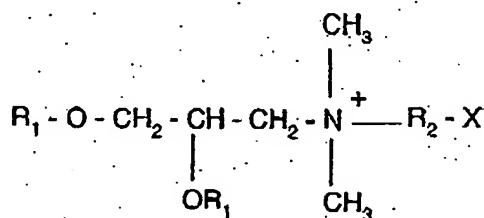
Pour les EMA®, x = 0 et y = 2. Pour les carbomères, x = y = 1.

Ces polymères sont dissous dans l'eau ou dans de l'eau physiologique (NaCl à 20 g/l) et le pH est ajusté à 7,3-7,4 par de la soude, pour donner la solution adjuvante dans laquelle les vecteurs d'expression seront incorporés.

La concentration en polymère dans la composition vaccinale finale peut  
5 notamment aller de 0,01 % à 1,5 % P/V, plus particulièrement de 0,05 à 1 % P/V, de préférence de 0,1 à 0,4 % P/V.

Les lipides cationiques (4) contenant un sel d'ammonium quaternaire, qui sont particulièrement mais pas exclusivement adaptés pour les plasmides, sont de préférence ceux qui répondent à la formule suivante :

10



dans laquelle R1 est un radical aliphatique linéaire, saturé ou insaturé, ayant 12 à 18 atomes de carbone, R2 est un autre radical aliphatique, renfermant 2 ou 3 atomes de carbone, et X un groupement hydroxyle ou amine.

15 Parmi ces lipides cationiques, on préfère le DMRIE (N-(2-hydroxyéthyl)-N,N-diméthyl-2,3-bis(tétradécyloxy)-1-propanammonium ; WO-A-96/34109), de préférence associé avec un lipide neutre, de préférence le DOPE (dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine ; Behr J. P., 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389), pour former le DMRIE-DOPE.

20 De préférence, le mélange plasmide avec cet adjuvant se fait de manière extemporanée et l'on préfère, avant son administration, laisser le temps au mélange ainsi constitué de se complexer, par exemple pendant une durée allant de 10 à 60 minutes, notamment de l'ordre de 30 minutes.

Lorsque du DOPE est présent, le ratio molaire DMRIE : DOPE va de  
25 préférence de 95 : 5 à 5 : 95, plus particulièrement de 1 : 1.

Le ratio pondéral plasmide : adjuvant DMRIE ou DMRIE-DOPE peut aller notamment de 50 : 1 à 1 : 10, en particulier de 10 : 1 à 1 : 5, et de préférence de 1 : 1 à 1 : 2.

La ou les cytokines (5) peuvent être apportée(s) sous forme de protéine à la composition ou vaccin, ou être co-exprimée(s) chez l'hôte avec le ou les immunogènes. La préférence va à la co-expression de la ou des cytokines, soit par le même vecteur que celui exprimant l'immunogène, soit par un vecteur propre.

Les cytokines peuvent notamment être choisies parmi : interleukine 18 (IL-18), interleukine 12 (IL-12), interleukine 15 (IL-15), MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ; Marshall E. *et al.*, Br. J. Cancer, 1997, 75(12), 1715-1720), GM-CSF (facteur de stimulation de la formation de colonies granulomacrophagiques, ou en anglais Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)). On peut citer en particulier des cytokines aviaires, notamment celles du poulet, telles que cIL-18 (Schneider K. *et al.*, J. Interferon Cytokine Res., 2000, 20(10), 879-883), cIL-15 (Xin K.-Q. *et al.*, Vaccine, 1999, 17, 858-866), et des cytokines équine, notamment le GM-CSF équin (WO-A-00/77210)). De manière préférée, on utilise les cytokines de l'espèce à vacciner.

WO-A-00/77210 décrit la séquence nucléotidique et la séquence en acides aminés correspondant au GM-CSF équin, la production de GM-CSF *in vitro* et la construction de vecteurs (plasmides et vecteurs viraux) permettant l'expression du GM-CSF équin *in vivo*. Ces protéine, plasmides et vecteurs viraux, peuvent être utilisés dans les compositions immunogènes et les vaccins équins selon l'invention. A titre d'exemple, on peut utiliser le plasmide pJP097 décrit à l'exemple 3 de cette demande antérieure ou utiliser l'enseignement de cette demande antérieure pour produire d'autres vecteurs ou pour produire *in vitro* du GM-CSF équin, et incorporer ces vecteurs ou ce GM-CSF équin dans les compositions immunogènes ou vaccins équins selon l'invention.

La présente invention a encore pour objet des compositions immunogènes et des vaccins dits de sous-unités, comprenant la protéine E, et éventuellement une ou plusieurs autres protéines du virus WN, notamment prM ou M, de préférence produits par expression *in vitro* comme décrit ci-dessus, et d'autre part un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

Les véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables sont parfaitement connus de l'homme du métier. A titre d'exemple, il peut s'agir de solution saline NaCl à 0,9% ou de tampon phosphate.

5 Les compositions immunogènes et les vaccins de sous-unités selon l'invention comprennent de préférence un ou plusieurs adjuvants, choisis notamment parmi les adjuvants usuels. Conviennent particulièrement bien dans le cadre de la présente invention : (1) un polymère de l'acide acrylique ou méthacrylique, un polymère d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, (2) une séquence immunostimulatrice (ISS), notamment une séquence  
10 oligodésoxyribonucléotidique ayant un ou plusieurs motifs CpG non méthylés (Kilman D. M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2879-2883 ; WO-A1-98/16247), (3) une émulsion huile-dans-l'eau en particulier l'émulsion SPT décrite à la page 147 de « Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach » edited by M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, et l'émulsion MF59 décrite à la  
15 page 183 du même ouvrage, (4) une émulsion eau-dans-l'huile (EP-A-639 071), (5) la saponine, en particulier Quil-A, ou (6) de l'hydroxyde d'alumine ou équivalent. Les différents types d'adjuvants définis sous 1), 2) et 3) ont été décrits précédemment plus en détail en regard des vaccins à base de vecteurs d'expression.

20 Les doses et volumes de dose sont définis plus loin dans le cadre de la description générale des méthodes d'immunisation et de vaccination.

Conformément à l'invention, la vaccination contre le virus WN peut être associée à d'autres vaccinations dans le cadre de programmes de vaccination, sous forme de kits d'immunisation ou de vaccination ou encore sous forme de  
25 compositions immunogènes et de vaccins multivalents, c'est-à-dire comprenant au moins un composant de vaccin contre le virus WN et au moins un composant de vaccin contre au moins un autre agent pathogène. Ceci inclut aussi l'expression par un même vecteur d'expression de gènes d'au moins deux agents pathogènes, virus WN inclus.

30 L'invention a ainsi pour objet une composition immunogène multivalente ou un vaccin multivalent contre le virus WN et contre au moins un autre pathogène de l'espèce cible, utilisant un même vecteur d'expression *in vivo* contenant et



exprimant au moins un polynucléotide du virus WN selon l'invention et au moins un polynucléotide exprimant un immunogène d'un autre pathogène.

Par « immunogène » ainsi exprimé, on entend notamment une protéine, glycoprotéine, polypeptide ou peptide, épitope ou dérivé, e.g. protéine de fusion, induisant une réponse immunitaire, de préférence protectrice.

Comme cela a été décrit précédemment, ces compositions ou vaccins multivalents comprennent aussi un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, et éventuellement un adjuvant.

L'invention a également pour objet une composition immunogène multivalente ou un vaccin multivalent comprenant au moins un vecteur d'expression *in vivo* dans lequel est insérée au moins un polynucléotide du virus WN selon l'invention et au moins un deuxième vecteur d'expression dans lequel est insérée un polynucléotide codant pour un immunogène d'un autre agent pathogène. Comme cela a été décrit précédemment, ces compositions ou vaccins multivalents comprennent aussi un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, et éventuellement un adjuvant.

Pour les compositions immunogènes et les vaccins multivalents, lesdits autres pathogènes équine sont notamment choisis parmi le groupe comprenant les virus de la rhinopneumonie équine EHV-1 et/ou EHV-4 (de préférence on associe des immunogènes de EHV-1 et EHV-4), virus de la grippe équine EIV, virus de l'encéphalite de l'Est EEV, virus de l'encéphalite de l'Ouest WEV, virus de l'encéphalite Vénézuélienne VEV (on préfère une combinaison des trois EEV, WEV et VEV), *Clostridium tetani* (tétanos), et leurs mélanges. De préférence, pour EHV on choisit les gènes gB et/ou gD ; pour EIV les gènes HA, NP et/ou N ; pour les virus des encéphalites C et/ou E2 ; pour *Clostridium tetani* le gène codant pour tout ou partie de la sous-unité C de la toxine tétanique. Ceci inclut l'utilisation de polynucléotides codant pour un fragment immunologiquement actif ou un épitope de cet immunogène.

Lesdits autres pathogènes aviaires sont notamment choisis parmi le groupe comprenant les virus de la maladie de Marek MDV (sérotypes 1 et 2, de préférence sérotype 1), virus de la maladie de Newcastle NDV, virus de la maladie de Gumboro IBDV, virus de la bronchite infectieuse IBV, virus de l'anémie

infectieuse CAV, virus de la laryngotrachéite infectieuse ILTV, virus de l'encéphalomyélite AEV (ou encore virus de la leucose aviaire ALV), virus de l'entérite hémorragique des dindes (HEV), virus de la pneumovirose (TRTV), virus de la peste aviaire (Influenza aviaire), virus de l'hydropéricardite du poulet, réovirus aviaires, *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Haemophilus avium*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella multocida gallicida*, et leurs mélanges. De préférence, pour MDV on choisit les gènes gB et/ou gD ; pour NDV les gènes HN et/ou F ; pour IBDV le gène VP2 ; pour IBV les gènes S (et plus particulièrement S1), M et/ou N ; pour CAV pour les gènes VP1 et/ou VP2, pour ILTV les gènes gB et/ou gD ; pour AEV les gènes env et/ou gag/pro, pour HEV les gènes 100K et hexon, pour TRTV les gènes F et/ou G ; pour la peste aviaire les gènes HA, N et/ou NP. Ceci inclut l'utilisation de polynucléotides codant pour un fragment immunologiquement actif ou un épitope de cet immunogène.

A titre d'exemple, dans une composition immunogène multivalente ou un vaccin multivalent selon l'invention, éventuellement adjuvé comme décrit ci-dessus, destiné à l'espèce équine, on peut incorporer un ou plusieurs des plasmides décrits dans WO-A-98/03198 et en particulier dans les exemples 8 à 25 de cette demande antérieure, et ceux décrits dans WO-A-00/77043 et qui concernent l'espèce équine, en particulier ceux décrits dans les exemples 6 et 7 de cette demande antérieure. Pour l'espèce aviaire, on peut incorporer par exemple un ou plusieurs des plasmides décrits dans WO-A1-98/03659 et en particulier dans les exemples 7 à 27 de cette demande antérieure.

Les compositions immunogènes ou les vaccins recombinés tels que décrits précédemment peuvent également être associés avec au moins un vaccin classique (inactivé, vivant atténué, sous-unités) dirigé contre au moins un autre pathogène.

De même, les compositions immunogènes et les vaccins de sous-unités selon l'invention peuvent faire l'objet de vaccination associée. L'invention a donc aussi pour objet des compositions immunogènes multivalentes et des vaccins multivalents, comprenant une ou des protéines selon l'invention, et un ou plusieurs immunogènes (le terme immunogène a été défini plus haut) d'au moins un autre

agent pathogène (notamment parmi la liste ci-dessus), et/ou encore un autre agent pathogène sous forme inactivée ou atténuée. Comme cela a été décrit précédemment, ces compositions ou vaccins multivalents comprennent aussi un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, et éventuellement un adjuvant.

La présente invention a aussi pour objet des méthodes d'immunisation et de vaccination des espèces cibles mentionnées ci-dessus.

Ces méthodes comprennent l'administration d'une quantité efficace d'une composition immunogène ou d'un vaccin selon l'invention. Cette administration peut se faire notamment par la voie parentérale, e.g. par administration sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, ou par la voie orale et/ou nasale.

Les différents vaccins peuvent être injectés par un injecteur à jet liquide sans aiguille. Pour les plasmides on peut aussi utiliser les particules d'or enrobées de plasmide et projetées de façon à pénétrer dans les cellules de la peau du sujet à immuniser (Tang *et al.* Nature 1992. 356. 152-154).

Les compositions immunogènes et les vaccins selon l'invention comprennent une quantité efficace de vecteur d'expression ou de polypeptide.

Dans le cas des compositions immunogènes ou des vaccins à base de plasmide, une dose comporte de manière générale de 10 µg environ à 2000 µg environ, notamment de 50 µg environ à 1000 µg environ. Les volumes de dose peuvent être compris entre 0,1 et 2 ml, de préférence entre 0,2 et 1 ml.

Ces doses et volumes de dose sont bien adaptés pour la vaccination des équins et des mammifères.

Pour la vaccination de l'espèce aviaire, une dose est plus particulièrement comprise entre environ 10 µg et environ 500 µg, et préférentiellement entre environ 50 µg et environ 200 µg. Les volumes de dose peuvent être plus particulièrement compris entre 0,1 et 1 ml, de préférence entre 0,2 et 0,5 ml.

L'homme de l'art possède les compétences nécessaires pour optimiser la dose efficace de plasmide à utiliser pour chaque protocole d'immunisation ou de vaccination et pour définir la meilleure voie d'administration.

Dans le cas des compositions immunogènes ou des vaccins à base de poxvirus, une dose est de manière générale comprise entre environ  $10^2$  pfu et environ  $10^9$  pfu.

Pour l'espèce équine et les mammifères, lorsque le vecteur est le virus de la vaccine, la dose est plus particulièrement comprise entre environ  $10^4$  pfu et environ  $10^9$  pfu, de préférence entre environ  $10^6$  et environ  $10^8$  pfu ; lorsque le vecteur est le virus canarypox, la dose est plus particulièrement comprise entre environ  $10^5$  pfu et environ  $10^9$  pfu, de préférence entre environ  $10^6$  et environ  $10^8$  pfu.

Pour l'espèce aviaire, lorsque le vecteur est le virus canarypox, la dose est plus particulièrement comprise entre environ  $10^3$  pfu et environ  $10^7$  pfu, de préférence entre environ  $10^4$  et environ  $10^6$  pfu ; lorsque le vecteur est le virus fowlpox, la dose est plus particulièrement comprise entre environ  $10^2$  pfu et environ  $10^5$  pfu, de préférence entre environ  $10^3$  et environ  $10^5$  pfu.

Dans le cas des compositions immunogènes ou des vaccins à base de vecteur viral autre que poxvirus, notamment virus herpès, une dose est de manière générale comprise entre environ  $10^3$  pfu et environ  $10^8$  pfu. Dans le cas des compositions immunogènes ou des vaccins aviaires une dose est de manière générale comprise entre environ  $10^3$  pfu et environ  $10^6$  pfu. Dans le cas des compositions immunogènes ou des vaccins équins une dose est de manière générale comprise entre environ  $10^6$  pfu et environ  $10^8$  pfu.

Les volumes de dose des compositions immunogènes et des vaccins équins à base de vecteurs viraux sont en général compris entre 1,0 et 2,0 ml, de préférence entre 0,5 et 2,0 ml, préférentiellement de 1,0 ml. Les volumes de dose des compositions immunogènes et des vaccins aviaires à base de vecteurs viraux sont en général compris entre 0,1 et 1,0 ml, de préférence entre 0,1 et 0,5 ml, préférentiellement entre 0,2 et 0,3 ml. L'homme de l'art possède aussi pour ce type de vaccin les compétences nécessaires pour optimiser le nombre d'administrations, la voie d'administration et les doses à utiliser pour chaque protocole d'immunisation.

Dans le cas des compositions immunogènes ou des vaccins de sous-unités, une dose comporte de manière générale de 10 µg environ à 2000 µg

environ, notamment de 50 µg environ à 1000 µg environ. Les volumes de dose des compositions immunogènes et des vaccins équin à base de vecteurs viraux sont en général compris entre 1,0 et 2,0 ml, de préférence entre 0,5 et 2,0 ml, préférentiellement de 1,0 ml. Les volumes de dose des compositions immunogènes et des vaccins aviaires à base de vecteurs viraux sont en général compris entre 0,1 et 1,0 ml, de préférence entre 0,1 et 0,5 ml, préférentiellement entre 0,2 et 0,3 ml. L'homme de l'art possède aussi pour ce type de vaccin les compétences nécessaires pour optimiser le nombre d'administrations, la voie d'administration et les doses à utiliser pour chaque protocole d'immunisation.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un vecteur d'expression in vivo ou d'une préparation de vecteurs ou de polypeptides selon l'invention pour la préparation d'une composition immunogène ou d'un vaccin destiné à protéger les espèces cibles contre le virus WN et éventuellement contre au moins un autre agent pathogène. Les différentes caractéristiques énoncées dans le reste de la description s'appliquent à cet autre objet de l'invention.

Un vaccin à base de plasmide ou un vaccin viral exprimant une ou plusieurs protéines du virus WN ou un vaccin de sous-unités WN selon la présente invention, n'induit pas chez l'animal vacciné la production d'anticorps contre les autres protéines de ce virus qui ne sont pas représentées dans la composition immunogène ou vaccin. Cette caractéristique peut être utilisée pour le développement de méthodes de diagnostic différentiel permettant de faire la distinction entre les animaux infectés par le virus pathogène WN et les animaux vaccinés à l'aide de vaccins selon l'invention. Chez ces derniers, ces protéines et/ou des anticorps dirigés contre elles sont présents et peuvent être détectés par une réaction antigène-anticorps. Ce n'est pas le cas chez les animaux vaccinés conformément à l'invention qui restent négatifs. Pour réaliser cette discrimination, on utilise une protéine qui n'est pas représentée dans le vaccin (non présente ou non exprimée), par exemple la protéine C ou la protéine NS1, NS2A, NS2B ou NS3 lorsqu'elle n'est pas représentée dans le vaccin.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation des vecteurs, préparations et polypeptides selon l'invention pour la préparation de compositions

immunogènes et de vaccins permettant de discriminer entre animaux vaccinés et animaux infectés.

Elle a aussi pour objet une méthode d'immunisation et de vaccination associée à une méthode de diagnostic permettant cette discrimination.

5 La protéine sélectionnée pour le diagnostic ou l'un de ses fragments ou épitopes est utilisée comme antigène dans le test de diagnostic, et/ou est utilisée pour produire des anticorps, polyclonaux ou monoclonaux. L'homme du métier dispose des connaissances et de la pratique pour produire ces anticorps et pour mettre en œuvre antigènes et/ou anticorps dans les techniques de diagnostic  
10 classiques, e.g. tests ELISA.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs.

#### 15 Exemples :

Toutes les constructions sont réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire (clonage, digestion par les enzymes de restriction, synthèse d'un ADN complémentaire simple brin, amplification en chaîne par polymérase, élongation d'un oligonucléotide par une ADN polymérase...) décrites  
20 par Sambrook J. et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention, ainsi que les divers fragments d'amplification en chaîne par polymérase (= ACP ou PCR), sont isolés et purifiés en utilisant le kit "GeneClean®" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

25

#### Exemple 1 : Culture du virus de la fièvre du Nil

Pour leur amplification, des virus de la fièvre du Nil NY99 (Lancioti R. S. et al., Science, 1999, 286, 2333-7) sont cultivées sur cellules VERO (cellules rénales de singe, accessible auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le  
30 numéro CCL-81).

Les cellules VERO sont mises en culture en Falcon 25 cm<sup>2</sup> avec du milieu Eagle-MEM supplémenté de 1 % d'extraits de levure et de 10 % de sérum de

veau contenant environ 100 000 cellules par ml. Les cellules sont cultivées à +37°C, sous atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>.

Après 3 jours la couche cellulaire arrive à confluence. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu Eagle-MEM supplémenté de 1 % d'extraits de levure et de 0,1 % d'albumine de sérum de boeuf et le virus de la fièvre du Nil est ajouté à raison de 5 pfu/cellule.

Lorsque l'effet cytopathogène (CPE) est complet (généralement 48-72 heures après le début de la mise en culture), les suspensions virales sont récoltées, puis clarifiées par centrifugation et congelées à -70°C. 3 à 4 passages successifs sont généralement nécessaires à la production d'un lot viral. Le lot viral est stocké à -70°C.

### **Exemple 2 : Extraction de l'ARN viral du virus de la fièvre du Nil**

L'ARN viral contenu dans 100 ml de suspension virale de la souche de virus de la fièvre du Nil NY99 est extrait après décongélation avec les solutions du kit « High Pure™ Viral RNA Kit » Cat # 1 858 882, Roche Molecular Biochemicals), en suivant les instructions du fournisseur pour les étapes d'extraction. Le culot d'ARN obtenu à la fin de l'extraction est resuspendu avec 1 à 2 ml d'eau distillée stérile sans RNase.

### **Exemple 3 : Construction du plasmide pFC101**

L'ADN complémentaire (ADNc) du virus de la fièvre du Nil NY99 est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « TI-ACP » ou « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral du virus de la fièvre du Nil NY99 (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC101 (30 mer) (SEQ ID NO :1)  
5' TTTTGTGAATTCGTTACCCTCTCTAACTTC 3'  
et FC102 (33 mer) (SEQ ID NO :2)



5' TTTTCTCTAGATTACCTCCGACTGCGTCTTGA 3'.

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction EcoRI et d'un site de restriction XbaI et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC102, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction ACP en présence du couple d'oligonucléotides FC101 et FC102 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 35 cycles (95°C pendant 1 min, puis 62°C pendant 1 min, et 72°C pendant 2 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 302 pb.

Ce fragment est digéré par EcoRI puis par XbaI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment EcoRI-XbaI d'environ 290 pb. Ce fragment est appelé fragment A.

Le plasmide d'expression eucaryote pVR1020 (C. J. Luke *et al.* J. of Infectious Diseases. 1997. 175. 95-97), dérivé du plasmide pVR1012 (figure 1 et exemple 7 de WO-A-98/03199 ; Hartikka J. *et al.*, 1997, Human Gene Therapy, 7, 1205-1217), contient la phase codante de la séquence-signal de l'activateur du plasminogène tissulaire humain (tPA).

Un plasmide pVR1020 est modifié par digestion BamHI-BglII et insertion d'une séquence contenant plusieurs sites de clonage (BamHI, NotI, EcoRI, XbaI, PmlI, PstI, BglII) et résultant de l'appariement des oligonucléotides suivants :

PB326 (40 mer) (SEQ ID NO :3)

5' gatctgcagcacgtgcttagaggatatcgaattcgcgcc 3' et

PB329 (40 mer) (SEQ ID NO :4)

5' GATCCGCGGCCGCGAATTCGATATCCTCTAGACACGTGCT 3'.

Le vecteur ainsi obtenu, d'une taille d'environ 5105 paires de bases (ou pb), est nommé pAB110.

Le fragment A est ligaturé avec le plasmide d'expression pAB110 préalablement digéré par XbaI et EcoRI, pour donner le plasmide pFC101 (5376 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce du cytomegalovirus humain ou hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early),

un insert codant pour la séquence-signal de l'activateur du tPA suivie de la séquence codant pour la protéine prM.

#### Exemple 4 : Construction du plasmide pFC102

L'ADN complémentaire (ADNc) du virus de la fièvre du Nil NY99 est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « TI-ACP » ou « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral du virus de la fièvre du Nil NY99 (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC103 (30 mer) (SEQ ID NO :5)

5' TTTTGAATTCTCACTGACAGTGCAGACA 3'

et FC104 (33 mer) (SEQ ID NO :6)

5' TTTTCTCTAGATTAGCTGTAAGCTGGGGCCAC 3'

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction EcoRI et d'un site de restriction XbaI et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC104, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction ACP en présence du couple d'oligonucléotides FC103 et FC104 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 35 cycles (95°C pendant 1 min, puis 62°C pendant 1 min, et 72°C pendant 2 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 252 pb.

Ce fragment est digéré par EcoRI puis par XbaI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment EcoRI-XbaI d'environ 240 pb. Ce fragment est ligaturé avec le plasmide d'expression pAB110 (exemple 3) préalablement digéré par XbaI et EcoRI, pour donner le plasmide pFC102 (5326 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce du cytomegalovirus humain ou hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early),

un insert codant pour la séquence-signal de l'activateur du tPA suivie de la séquence codant pour la protéine M.

#### Exemple 5 : Construction du plasmide pFC103

L'ADN complémentaire (ADNc) du virus de la fièvre du Nil NY99 est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « TI-ACP » ou « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral du virus de la fièvre du Nil NY99 (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC105 (30 mer) (SEQ ID NO :7)

5' TTTTGAATTCTTCAACTGCCTTGAATG 3'

et FC106 (33 mer) (SEQ ID NO :8).

5' TTTTCTAGATTAAGCGTGACGTTACGGA 3'.

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction EcoRI et d'un site de restriction XbaI et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC106, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction ACP en présence du couple d'oligonucléotides FC105 et FC106 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 35 cycles (95°C pendant 1 min, puis 62°C pendant 1 min, et 72°C pendant 2 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 1530 pb.

Ce fragment est digéré par EcoRI puis par XbaI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment EcoRI-XbaI d'environ 1518 pb. Ce fragment est ligaturé avec le plasmide d'expression pAB110 (exemple 3) préalablement digéré par XbaI et EcoRI, pour donner le plasmide pFC103 (6604 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce du cytomégalo virus humain ou hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early),

un insert codant pour la séquence-signal de l'activateur du tPA suivie de la séquence codant pour la protéine E.

#### Exemple 6 : Construction du plasmide pFC104

5 L'ADN complémentaire (ADNc) du virus de la fièvre du Nil NY99 est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

10 Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « TI-ACP » ou « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral du virus de la fièvre du Nil NY99 (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC101 (30 mer) (SEQ ID NO :1)  
et FC106 (33 mer) (SEQ ID NO :8).

15 Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction EcoRI et d'un site de restriction XbaI et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC106, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

20 Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction ACP en présence du couple d'oligonucléotides FC101 et FC106 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 35 cycles (95°C pendant 1 min, puis 62°C pendant 1 min, et 72°C pendant 2 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 2031 pb.

25 Ce fragment est digéré par EcoRI puis par XbaI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment EcoRI-XbaI d'environ 2019 pb. Ce fragment est ligaturé avec le plasmide d'expression pAB110 (exemple 3) préalablement digéré par XbaI et EcoRI, pour donner le plasmide pFC104 (7105 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce du  
30 cytomégalovirus humain ou hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un insert codant pour la séquence-signal de l'activateur du tPA suivie de la séquence codant pour la protéine prM-M-E.

### Exemple 7 : Construction du plasmide pFC105

L'ADN complémentaire (ADNc) du virus de la fièvre du Nil NY99 est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « TI-ACP » ou « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral du virus de la fièvre du Nil NY99 (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC107 (36 mer) (SEQ ID NO :9)

5' TTTTITGATATCACCGGAATTGCAGTCATGATTGGC 3'

et FC106 (33 mer) (SEQ ID NO :8).

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction EcoRV et d'un site de restriction XbaI et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC106, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction ACP en présence du couple d'oligonucléotides FC106 et FC107 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 35 cycles (95°C pendant 1 min, puis 62°C pendant 1 min, et 72°C pendant 2 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 2076 pb.

Ce fragment est digéré par EcoRV puis par XbaI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment EcoRV-XbaI d'environ 2058 pb.

Ce fragment est ligaturé avec le plasmide d'expression pVR1012, préalablement digéré par XbaI et EcoRV, pour donner le plasmide pFC105 (6953 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce du cytomégalo virus humain ou hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un insert codant pour la polyprotéine prM-M-E.

### Exemple 8 : Construction du plasmide pFC106

L'ADN complémentaire (ADNc) du virus de la fièvre du Nil NY99 est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat. # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

5. Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « TI-ACP » ou « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral du virus de la fièvre du Nil NY99 (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC108 (36 mer) (SEQ ID NO :10)  
 10 5' TTTTGTGATATCATGTATAATGCTGATATGATTGAC 3'  
 et FC109 (36 mer) (SEQ ID NO :11)  
 5' TTTTCTCTAGATTAACGTTTCCCGAGGCGAAGTC 3'.

- 15 Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction EcoRV et d'un site de restriction XbaI, d'un codon ATG initiateur en 5' et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC109, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

- 20 Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction ACP en présence du couple d'oligonucléotides FC108 et FC109 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 35 cycles (95°C pendant 1 min, puis 62°C pendant 1 min, et 72°C pendant 2 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 2973 pb.

- 25 Ce fragment est digéré par EcoRV puis par XbaI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment EcoRV-XbaI d'environ 2955 pb.

- 30 Ce fragment est ligaturé avec le plasmide d'expression pVR1012, préalablement digéré par XbaI et EcoRV, pour donner le plasmide pFC106 (7850 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce du cytomegalovirus humain ou hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un insert codant pour la polyprotéine NS2A-NS2B-NS3.

**Exemple 9 : construction du plasmide donneur pour l'insertion dans le site C5 du virus canarypox ALVAC**

La figure 16 du brevet US-A-5,756,103 montre la séquence d'un fragment de 3199 pb de l'ADN génomique du virus canarypox. L'analyse de cette séquence a révélé un cadre ouvert de lecture (COL) qui a été appelé C5L, qui commence à la position 1538 et se termine à la position 1859. La construction d'un plasmide d'insertion aboutissant à la délétion du COL C5L et à son remplacement par un site de clonage multiple flanqué de signaux d'arrêt de transcription et de traduction a été réalisée comme décrit ci-après.

Une réaction-ACP a été réalisée à partir de la matrice constituée par l'ADN génomique du virus canarypox et avec les oligonucléotides suivants :

C5A1 (42 mer) (SEQ ID NO :12) :

5' ATCATCGAGCTCCAGCTGTAATTCATGGTCGAAAAGAAGTGC 3'

et C5B1 (73 mer) (SEQ ID NO :13) :

5' GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTTTTATAGCTAATTAGTCATTTT  
TTGAGAGTACCACTTCAGCTACCTG 3'

pour isoler un fragment ACP de 223 pb (fragment B).

Une réaction ACP a été réalisée à partir de la matrice constituée par l'ADN génomique du virus canarypox et avec les oligonucléotides suivants :

C5C1 (72 mer) (SEQ ID NO :14) :

5' CCGGGGCTGCAGCTCGAGGAATCTTTTTATTGATTAAGTACATTA  
TAAAGATCTAAAATGCATAATTTTC 3'

et C5D1 (45 mer) (SEQ ID NO :15) :

5' GATGATGGTACCGTAAACAAATATAATGAAAAGTATTCTAAACTA 3'

pour isoler un fragment ACP de 482 pb (fragment C).

Les fragments B et C ont été hybridés ensemble pour servir de matrice à une réaction ACP réalisée avec les oligonucléotides C5A1 (SEQ ID NO :12) et C5D1 (SEQ ID NO :15) pour générer un fragment ACP de 681 pb. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction SacI et KpnI, pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment SacI-KpnI de 664 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBlueScript® II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA, Cat # 212205), préalablement digéré par les enzymes de restriction SacI et KpnI,



pour donner le plasmide pC5L. La séquence de ce plasmide a été vérifiée par séquençage. Ce plasmide contient 166 pb de séquences situées en amont du COL C5L (« bras flanquant gauche C5 »), un signal vaccine d'arrêt précoce de transcription, des codons stops dans les 6 phases de lecture, un site de clonage multiple contenant les sites de restriction SmaI, PstI, XhoI et EcoRI, et enfin 425 pb de séquences situées en aval du COL C5L (« bras flanquant droit C5 »).

Le plasmide pMP528HRH (Perkus M. et al. J. Virol. 1989. 63. 3829-3836) a été utilisé comme matrice pour amplifier la séquence complète du promoteur vaccine H6 (N° d'accès GenBank M28351) avec les oligonucléotides suivants :

10 JCA291 (34 mer) (SEQ ID NO :16)

5' AAACCCGGGTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTG 3'

et JCA292 (43 mer) (SEQ ID NO :17)

5' AAAAGAATTCGTGCGACTACGATACAACTTAACGGATATCGCG 3'

pour amplifier un fragment ACP de 149 pb. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction SmaI et EcoRI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction SmaI-EcoRI de 138 pb. Ce fragment a alors été ligaturé avec le plasmide pC5L, préalablement digéré par SmaI et EcoRI, pour donner le plasmide pFC107.

#### 20 Exemple 10 : construction du virus recombiné vCP1712

Une réaction ACP a été réalisée en utilisant le plasmide pFC105 (exemple 7) comme matrice et les oligonucléotides suivants :

FC110 (33 mer) (SEQ ID NO :18) :

5' TTTTCGCGAACCGGAATTGCAGTCATGATTGGC 3'

25 et FC111 (39 mer) (SEQ ID NO :19) :

5' TTTTGTGCGACGCGGCCGCTTAAGCGTGACGTTTCACGGA 3'

pour amplifier un fragment ACP d'environ 1533 pb. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction NruI et Sall pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction NruI-Sall d'environ 1518 pb. Ce fragment a été ensuite ligaturé avec le plasmide pFC107 (exemple 9) préalablement digéré par les enzymes de restriction NruI et Sall pour donner le plasmide pFC108.

Le plasmide pFC108 a été linéarisé par NotI, puis transfecté dans des cellules primaires d'embryons de poulets infectées avec du virus canarypox (souche ALVAC) selon la technique de précipitation au phosphate de calcium précédemment décrite (Panicali et Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982. 79. 4927-4931 ; Piccini *et al.* In Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. and Grossman L. Academic Press). Des plages positives ont été sélectionnées sur la base d'une hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique de la séquence nucléotidique de la glycoprotéine d'enveloppe E. Ces plages ont subi 4 cycles successifs de sélection/purification de plages jusqu'à ce qu'une population pure ait été isolée. Une plage représentative de la recombinaison *in vitro* entre le plasmide donneur pFC108 et le génome du virus canarypox ALVAC a alors été amplifiée et le stock de virus recombiné obtenu a été désigné vCP1712.

#### Exemple 11 : construction du virus recombiné vCP1713

Le plasmide pFC104 (exemple 6) est digéré par les enzymes de restriction Sall et PmlI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction PmlI-Sall d'environ 2213 pb. Ce fragment est ligaturé avec le plasmide pFC107 (exemple 9) préalablement digéré par les enzymes de restriction NruI et Sall pour donner le plasmide pFC109.

Le plasmide pFC109 a été linéarisé par NotI, puis transfecté dans des cellules primaires d'embryons de poulets infectées avec du virus canarypox (souche ALVAC) selon la technique de l'exemple 10. Une plage représentative de la recombinaison *in vitro* entre le plasmide donneur pFC109 et le génome du virus canarypox ALVAC a été sélectionnée sur la base d'une hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique de la séquence nucléotidique de la glycoprotéine d'enveloppe E et a été ensuite amplifiée. Le stock de virus recombiné obtenu a été désigné vCP1713.

#### Exemple 12 : construction du virus recombiné vCP1714

Le plasmide pFC103 (exemple 5) est digéré par les enzymes de restriction Sall et PmlI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction PmlI-Sall d'environ 1712 pb. Ce fragment est ligaturé avec le plasmide

pFC107 (exemple 9) préalablement digéré par les enzymes de restriction NruI et Sall pour donner le plasmide pFC110.

Le plasmide pFC110 a été linéarisé par NotI, puis transfecté dans des cellules primaires d'embryons de poulets infectées avec du virus canarypox (souche ALVAC) selon la technique de l'exemple 10. Une plaque représentative de la recombinaison *in vitro* entre le plasmide donneur pFC110 et le génome du virus canarypox ALVAC a été sélectionnée sur la base d'une hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique de la séquence nucléotidique de la glycoprotéine d'enveloppe E et a été ensuite amplifiée. Le stock de virus recombiné obtenu a été désigné vCP1714.

#### Exemple 13 : construction du virus recombiné vCP1715

Le plasmide pFC102 (exemple 4) est digéré par les enzymes de restriction Sall et PmlI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction PmlI-Sall d'environ 434 pb. Ce fragment est ligaturé avec le plasmide pFC107 (exemple 9) préalablement digéré par les enzymes de restriction NruI et Sall pour donner le plasmide pFC111.

Le plasmide pFC111 a été linéarisé par NotI, puis transfecté dans des cellules primaires d'embryons de poulets infectées avec du virus canarypox (souche ALVAC) selon la technique de l'exemple 10. Une plaque représentative de la recombinaison *in vitro* entre le plasmide donneur pFC111 et le génome du virus canarypox ALVAC a été sélectionnée sur la base d'une hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique de la séquence nucléotidique de la glycoprotéine de membrane M et a été ensuite amplifiée. Le stock de virus recombiné obtenu a été désigné vCP1715.

#### Exemple 14 : construction du virus recombiné vCP1716

Le plasmide pFC101 (exemple 3) est digéré par les enzymes de restriction Sall et PmlI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction PmlI-Sall d'environ 484 pb. Ce fragment est ligaturé avec le plasmide pFC107 (exemple 9) préalablement digéré par les enzymes de restriction NruI et Sall pour donner le plasmide pFC112.

Le plasmide pFC112 a été linéarisé par NotI, puis transfecté dans des cellules primaires d'embryons de poulets infectées avec du virus canarypox (souche ALVAC) selon la technique de l'exemple 10. Une plaque représentative de la recombinaison *in vitro* entre le plasmide donneur pFC112 et le génome du virus canarypox ALVAC a été sélectionnée sur la base d'une hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique de la séquence nucléotidique de la glycoprotéine de pré-membrane prM et a été ensuite amplifiée. Le stock de virus recombiné obtenu a été désigné vCP1716.

#### Exemple 15 : construction du plasmide donneur pour l'insertion dans le site C6 du virus canarypox ALVAC

La figure 4 du brevet WO-A-01/05934 montre la séquence d'un fragment de 3700 pb de l'ADN génomique du virus canarypox. L'analyse de cette séquence a révélé un cadre ouvert de lecture (COL) qui a été appelé C6L, qui commence à la position 377 et se termine à la position 2254. La construction d'un plasmide d'insertion aboutissant à la délétion du COL C6L et à son remplacement par un site de clonage multiple flanqué de signaux d'arrêt de transcription et de traduction a été réalisée comme décrit ci-après.

Une réaction ACP a été réalisée à partir de la matrice constituée par l'ADN génomique du virus canarypox et avec les oligonucléotides suivants :

C6A1 (42 mer) (SEQ ID NO :20) :

5' ATCATCGAGCTCGCGGCCGCGCTATCAAAAGTCTTAATGAGTT 3'

et C6B1 (73 mer) (SEQ ID NO :21) :

5'GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTTTTATAGCTAATTAGTCATTTT  
TTCGTAAGTAAGTATTTTATTTAA 3'

pour isoler un fragment ACP de 432 pb (fragment D).

Une réaction ACP a été réalisée à partir de la matrice constituée par l'ADN génomique du virus canarypox et avec les oligonucléotides suivants :

C6C1 (72 mer) (SEQ ID NO :22) :

5'CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTATTGATTAAGTCAAAAT  
GAGTATATATAATTGAAAAAGTAA 3'

et C6D1 (45 mer) (SEQ ID NO :23) :

5' GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAAACTTAAGTTG 3'

pour isoler un fragment ACP de 1210 pb (fragment E).

Les fragments D et E ont été hybridés ensemble pour servir de matrice à une réaction ACP réalisée avec les oligonucléotides C6A1 (SEQ ID NO :20) et C6D1 (SEQ ID NO :23) pour générer un fragment ACP de 1630 pb. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction SacI et KpnI, pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment SacI-KpnI de 1613 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBlueScript® II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA, Cat # 212205), préalablement digéré par les enzymes de restriction SacI et KpnI, pour donner le plasmide pC6L. La séquence de ce plasmide a été vérifiée par séquençage. Ce plasmide contient 370 pb de séquences situées en amont du COL C6L (« bras flanquant gauche C6 »), un signal vaccine d'arrêt précoce de transcription, des codons stops dans les 6 phases de lecture, un site de clonage multiple contenant les sites de restriction SmaI, PstI, XhoI et EcoRI, et enfin 1156 pb de séquences situées en aval du COL C6L (« bras flanquant droit C6 »).

Le plasmide pMPIVC (Schmitt J. F. C. et al., J. Virol., 1988, 62, 1889-1897 ; Saiki R. K. et al., Science, 1988, 239, 487-491) a été utilisé comme matrice pour amplifier la séquence complète du promoteur vaccine I3L avec les oligonucléotides suivants :

20 FC112 (33 mer) (SEQ ID NO :24) :

5' AAACCCGGGCGGTGGTTTGCGATTCCGAAATCT 3'

et FC113 (43 mer) (SEQ ID NO :25) :

5' AAAAGAATTCGGATCCGATTAAACCTAAATAATTGTACTTTGT 3'

pour amplifier un fragment ACP de 151 pb. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction SmaI et EcoRI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction SmaI-EcoRI d'environ 136 pb. Ce fragment a alors été ligaturé avec le plasmide pC6L, préalablement digéré par SmaI et EcoRI, pour donner le plasmide pFC113.

### 30 Exemple 16 : construction des virus recombinés vCP1717 et vCP1718

Une réaction ACP a été réalisée en utilisant le plasmide pFC106 (exemple 8) comme matrice et les oligonucléotides suivants :

FC114 (33 mer) (SEQ ID NO :26) :

5' TTTGACGTGATGTATAATGCTGATATGATTGAC 3'

et FC115 (42 mer) (SEQ ID NO :27) :

5' TTTTGGATCCGCGGCCGCTTAACGTTTTCCCGAGGCGAAGTC 3'

5 pour amplifier un fragment ACP d'environ 2973 pb. Ce fragment a été digéré avec les enzymes de restriction PmlI et BamHI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment de restriction PmlI-BamHI d'environ 2958 pb (fragment F). Le plasmide pFC113 (exemple 15) a été digéré par les enzymes de restriction PmlI et BamHI pour isoler, après électrophorèse en gel  
10 d'agarose, le fragment de restriction PmlI-BamHI d'environ 4500 pb (fragment G). Les fragments F et G ont alors été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pFC114.

Le plasmide pFC114 a été linéarisé par NotI, puis transfecté dans des cellules primaires d'embryons de poulets infectées avec du virus canarypox  
15 vCP1713 (exemple 11) selon la technique de précipitation au phosphate de calcium précédemment décrite (Panicali et Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982. 79. 4927-4931 ; Piccini et al. In Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. and Grossman L. Academic Press). Des plages positives ont été sélectionnées sur la base d'une hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique de la  
20 séquence nucléotidique de la glycoprotéine d'enveloppe E. Ces plages ont subi 4 cycles successifs de sélection/purification de plages jusqu'à ce qu'une population pure ait été isolée. Une plage représentative de la recombinaison *in vitro* entre le plasmide donneur pFC114 et le génome du virus canarypox ALVAC a alors été amplifiée et le stock de virus recombiné obtenu a été désigné vCP1717.

25 Le plasmide pFC114 linéarisé par NotI a également servi à transfecter des cellules primaires d'embryons de poulets infectées avec du virus canarypox vCP1712 (exemple 10) selon la technique décrite ci-dessus. Le stock de virus recombiné ainsi obtenu a été désigné vCP1718.

### 30 Exemple 21 : Production de vaccins recombinés

Pour la préparation de vaccins équins, le virus recombiné canarypox vCP1712 (exemple 10) est adjuvé avec des solutions de carbomère, à savoir

Carbopol™ 974P fabriqué par BF Goodrich, Ohio, USA (poids moléculaire d'environ 3 000 000).

Une solution stock à 1,5 % de Carbopol™ 974P est initialement préparée dans de l'eau distillée contenant 1 g/l de chlorure de sodium. Cette solution stock est alors utilisée pour l'élaboration d'une solution à 4 mg/ml de Carbopol™ 974P en eau physiologique. La solution stock est mélangée au volume adéquat d'eau physiologique, soit en une étape unique soit en plusieurs étapes successives, la valeur du pH est ajustée à chaque étape avec une solution d'hydroxyde de sodium 1N (ou encore plus concentrée) afin d'obtenir une valeur finale de pH de 7,3-7,4.

La solution de Carbopol™ 974P prête à l'emploi ainsi obtenue est utilisée pour reprendre des virus recombinés lyophilisés ou pour diluer des solutions stocks concentrées de virus recombinés. Par exemple, pour obtenir une suspension virale contenant  $10^8$  pfu par dose de 1 ml, on dilue une solution virale stock de manière à obtenir un titre de  $10^{8,3}$  pfu/ml, puis on dilue à parties égales avec ladite solution de Carbopol™ 974P prête à l'emploi à 4 mg/ml.

Des vaccins recombinés peuvent également être produits avec des virus recombinés canarypox vCP1713 (exemple 11) ou vCP1717 (exemple 16) ou vCP1718 (exemple 16) ou un mélange des trois virus canarypox vCP1714 (exemple 12), vCP1715 (exemple 13) et vCP1716 (exemple 14) selon la technique décrite ci-dessus.

#### **Exemple 22 : Production de vaccins ADN pour les équins**

Une solution d'ADN contenant le plasmide pFG104 (exemple 6) est concentrée par précipitation éthanolique comme décrit dans Sambrook et al (1989). Le culot d'ADN est repris par une solution de NaCl 0.9% de façon à obtenir une concentration de 1 mg/ml. Une solution à 0,75 mM de DMRIE-DOPE (1 : 1) est préparée par reprise d'un lyophilisat de DMRIE-DOPE par un volume adapté d'H<sub>2</sub>O stérile.

La formation des complexes ADN plasmidique-lipide est réalisée par dilution à parties égales de la solution de DMRIE-DOPE 0.75 mM par la solution d'ADN à 1 mg/ml dans NaCl 0.9%. La solution d'ADN est introduite progressivement à l'aide d'une aiguille sertie 26G le long de la paroi du flacon



contenant la solution de lipide cationique de façon à éviter la formation de mousse. On procède à une agitation douce dès que les deux solutions sont mélangées. On obtient en final une composition comprenant 0,375 mM de DMRIE-DOPE et 500 µg/ml de plasmide.

Il est souhaitable que l'ensemble des solutions utilisées soient à température ambiante pour l'ensemble des opérations décrites ci-dessus. On laisse la complexation ADN/DMRIE-DOPE se mettre en place à température ambiante pendant 30 minutes avant de procéder à l'immunisation des animaux.

Des vaccins ADN peuvent également être produits avec des solutions d'ADN contenant les plasmides pFC104 (exemple 6) et pFC106 (exemple 8), ou contenant les plasmides pFC105 (exemple 7) et pFC106, ou contenant les plasmides pFC101, pFC102 et pFC103 (exemples 3 à 5), ou contenant le plasmide pFC105 selon la technique décrite dans le présent exemple.

#### Exemple 23 : Tests d'expression *In vitro*

L'expression des protéines WN est testée pour chaque construction par les méthodes classiques d'immunofluorescence indirecte et de Western Blot.

Ces tests sont effectués sur des plaques 96 puits contenant les cellules CHO cultivées en monocouches et transfectées par des plasmides ou contenant les cellules CEF cultivées en monocouches et infectées par des virus recombinés.

Les protéines WN sont détectées par utilisation de sérums de chevaux ou de poulets infectés et d'anti-sérums marqués.

La taille des fragments obtenus après migration sur gel d'agarose est comparée à celles attendues.

#### Exemple 24 : Efficacité sur animaux

Les vaccins recombinés et les vaccins plasmidiques sont injectés à deux reprises à environ deux semaines d'intervalle à des poulets EOPS, âgés d'environ 7 jours, non vaccinés, par voie intramusculaire sous un volume d'environ 0,1 ml. Un groupe témoin non vacciné est incorporé à l'étude.

Les poulets sont éprouvés par administration sous-cutanée dans le cou de  $10^{3-4}$  TCID<sub>50</sub> de virus WN pathogène.

Sont observés d'une part la virémie, la réponse en anticorps ainsi que la mortalité. Des autopsies sont pratiquées pour observer les lésions.

**Exemple 25 : Titrage des anticorps neutralisants anti-WNV.**

5 Des séries de dilution sont réalisées pour chaque sérum avec une raison de 3 dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal dans des plaques à 96 puits type culture cellulaire. A 0,05 ml du sérum dilué est ajouté 0,05 ml de milieu de culture contenant approximativement 200 DICC<sub>50</sub>/ml de WNV. Ce mélange est incubé pendant 2 heures à 37°C en étuve en atmosphère contenant  
10 5% CO<sub>2</sub>.

0,15 ml d'une suspension de cellules VERO contenant environ 100 000 cellules par ml est ensuite ajouté à chaque mélange. L'effet cytopathique (ECP) est observé par microscopie à contraste de phase après 4-5 jours de culture à 37°C en atmosphère contenant 5% CO<sub>2</sub>. Les titres neutralisants de chaque sérum  
15 sont calculés d'après la méthode de Kärber. Les titres sont donnés sous la forme de la dilution la plus importante inhibant l'effet cytopathique pour 50 % des puits. Les titres sont exprimés en log<sub>10</sub> VN<sub>50</sub>. Chaque sérum est titré au moins deux fois, de préférence quatre fois.

20 Il doit être bien compris que l'invention définie par les revendications annexées n'est pas limitée aux modes de réalisation particuliers indiqués dans la description ci-dessus, mais englobe les variantes qui ne sortent ni du cadre ni de l'esprit de la présente invention.

## REVENDICATIONS

1. Vaccin contre le virus WN, notamment pour protéger les équidés, les canidés, les félidés, les bovidés, les suidés et les oiseaux, comprenant la protéine structurale E du virus WN ou un polynucléotide codant pour cette protéine E, et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.
2. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur d'expression *in vivo* comprenant un polynucléotide codant pour la protéine structurale E du virus WN, et les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide dans une cellule hôte.
3. Vaccin selon la revendication 2, caractérisé en ce que le polynucléotide code aussi pour la protéine de pré-membrane prM et/ou pour la protéine de membrane M.
4. Vaccin selon la revendication 2, caractérisé en ce que le polynucléotide code pour prM-M-E.
5. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le polynucléotide code aussi pour un peptide signal.
6. Vaccin selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un peptide signal du virus WN.
7. Vaccin selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un peptide signal hétérologue.
8. Vaccin selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit du peptide signal de l'activateur tissulaire du plasminogène humain.
9. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 2 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend un autre polynucléotide codant pour une protéine d'une autre souche de virus WN et/ou d'un autre agent pathogène et/ou pour une cytokine.
10. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend un autre vecteur d'expression comprenant un autre polynucléotide codant pour une protéine.
11. Vaccin selon la revendication 10, caractérisé en ce que cet autre vecteur comporte un polynucléotide codant pour une protéine du virus WN choisie parmi prM, M et prM-M.

12. Vaccin selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'autre vecteur d'expression comprend un polynucléotide codant pour E d'une autre souche de virus WN.

13. Vaccin selon la revendication 10, formant un vaccin multivalent, caractérisé en ce que l'autre vecteur d'expression comprend un polynucléotide codant pour un immunogène d'un autre agent pathogène.

14. Vaccin selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'autre vecteur d'expression comprend un polynucléotide codant pour une cytokine.

15. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisé en ce que le vecteur d'expression *in vivo* est un vecteur viral.

16. Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce que le vecteur d'expression viral est un poxvirus, un adénovirus, ou un herpesvirus.

17. Vaccin selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un poxvirus choisi parmi le virus de la vaccine, les avipox, en particulier canarypox ou fowlpox, le swinepox, le racoonpox et le camelpox.

18. Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce que le vecteur d'expression est un adénovirus aviaire, canin, bovin, porcin ou humain.

19. Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce que le vecteur d'expression est un virus herpes choisi parmi EHV-1, EHV-4, CHV, FHV, BHV, PRS, MDV, HVT et virus herpes du canard.

20. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 2 à 15, caractérisé en ce que le vecteur d'expression *in vivo* est un plasmide qui comporte les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide *in vivo*.

21. Vaccin selon l'une quelconque des revendication 2 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend un adjuvant.

22. Vaccin selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'adjuvant est choisi parmi (1) les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique et les polymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, (2) les séquences immunostimulatrices, (3) une émulsion huile-dans-l'eau, (4) les lipides cationiques contenant un sel d'ammonium quaternaire, (5) les cytokines.

23. Vaccin selon la revendication 22, caractérisé en ce que le ou les vecteurs sont des vecteurs viraux et en ce que l'adjuvant est un polymère de

l'acide acrylique ou méthacrylique ou un polymère d'anhydride maléique et de dérivé alcényle.

24. Vaccin selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'adjuvant est un carbomère.

5 25. Vaccin selon la revendication 22, caractérisé en ce que le ou les vecteurs d'expression sont des plasmides et en ce que l'adjuvant est un lipide cationique contenant un sel d'ammonium quaternaire.

26. Vaccin selon la revendication 25, caractérisé en ce que le lipide cationique contenant un sel d'ammonium quaternaire comprend du DMRIE, de  
10 préférence associé avec un lipide neutre.

27. Vaccin selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'adjuvant est le DMRIE-DOPE.

28. Vaccin selon la revendication 9, 14 ou 22, caractérisé en ce que la cytokine est une cytokine équine ou une cytokine aviaire.

15 29. Vaccin selon la revendication 28, caractérisé en ce que la cytokine est choisie parmi interleukine 18, interleukine 12, interleukine 15, MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF.

30. Vaccin selon la revendication 28, caractérisé en ce que la cytokine est choisie parmi les interleukines aviaires cIL-18, cIL-15.

20 31. Vaccin selon la revendication 28, caractérisé en ce que la cytokine est le GM-CSF équin.

32. Vaccin selon la revendication 1, comprenant la protéine structurale E du virus WN et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, éventuellement la protéine de pré-membrane prM et/ou la protéine de membrane  
25 M, et un adjuvant.

33. Vaccin selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'adjuvant est choisi parmi (1) polymère de l'acide acrylique ou méthacrylique ou polymère d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, (2) séquence immunostimulatrice, (3) émulsion huile-dans-l'eau, (4) émulsion eau-dans-l'huile, (5) saponine, ou (6)  
30 hydroxyde d'alumine.

34. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 33, formant un vaccin multivalent, caractérisé en ce qu'il comprend un composant de vaccin contre un autre agent pathogène.

35. Vaccin selon la revendication 34, caractérisé en ce que le composant contre un autre agent pathogène comporte un immunogène sous forme de sous-unité, de l'agent inactivé ou de l'agent atténué, ou bien encore un vecteur d'expression code pour un immunogène de cet autre agent pathogène.

36. Vaccin selon la revendication 34 ou 35, caractérisé en ce qu'il comprend un composant de vaccin contre le virus de la rhinopneumonie équine, contre le virus de la grippe équine, contre le virus de l'encéphalite de l'Est, contre le virus de l'Encéphalite de l'Ouest, contre le virus de l'Encéphalite Vénézuélienne, contre *Clostridium tetani*, et leurs mélanges.

37. Vaccin selon la revendication 34 ou 35, caractérisé en ce qu'il comprend un composant de vaccin contre le virus de la maladie de Marek, contre le virus de la maladie de Newcastle, contre le virus de la maladie de Gumboro, contre le virus de la bronchite infectieuse, contre le virus de l'anémie infectieuse, contre le virus de la laryngotrachéite infectieuse, contre le virus de l'encéphalomyélite, contre le virus de l'entérite hémorragique, contre le virus de la pneumovirose, contre le virus de la peste aviaire, contre le virus de l'hydropéricardite du poulet, contre le réovirus aviaires, contre *Escherichia coli*, contre *Mycoplasma gallinarum*, contre *Mycoplasma gallisepticum*, contre *Haemophilus avium*, contre *Pasteurella gallinarum*, contre *Pasteurella multocida gallicida*, et leurs mélanges.

38. Vecteur d'expression *in vivo* ou *in vitro*, comprenant comme unique polynucléotide du virus WN, un polynucléotide codant pour la protéine E et éventuellement un peptide signal du virus WN, et les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide.

39. Vecteur d'expression *in vivo* ou *in vitro*, comprenant comme unique polynucléotide du virus WN, un polynucléotide codant pour la protéine E et pour prM et/ou M, et éventuellement un peptide signal du virus WN, et les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide.

40. Vecteur d'expression *in vivo* ou *in vitro*, comprenant comme unique polynucléotide du virus WN, un polynucléotide codant pour prM-M-E et éventuellement un peptide signal du virus WN, et les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide.
- 5 41. Plasmide comprenant un polynucléotide codant pour la protéine E et les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide *in vivo*.
42. Vecteur herpès, de préférence HVT ou EHV, comprenant un polynucléotide codant pour la protéine E et les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide *in vivo*.
- 10 43. Vecteur pox choisi parmi les avipox, le swinepox, le racoonpox et le camelpox, de préférence canarypox ou fowlpox, comprenant un polynucléotide codant pour la protéine E et les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide *in vivo*.
44. Vecteur adénovirus comprenant un polynucléotide codant pour la
- 15 protéine E et les éléments nécessaires à l'expression du polynucléotide *in vivo*.
45. Plasmide ou vecteur selon l'une des revendications 38 à 44, caractérisé en ce que le polynucléotide code pour prM-M-E.



## MÉRIAL

## VACCIN CONTRE LE VIRUS DE LA FIEVRE DU NIL

5

L'invention concerne des vecteurs d'expression *in vivo* et *in vitro* comprenant un polynucléotide codant pour la protéine structurale E du virus de la fièvre du Nil ou virus WN, éventuellement associé à un polynucléotide codant pour la protéine de pré-membrane prM et/ou pour la protéine de membrane M, notamment sous la forme codant pour prM-M-E. Des vaccins vivants incorporent de tels vecteurs d'expression *in vivo*. Les vecteurs d'expression *in vitro* sont utilisés pour produire les protéines *in vitro* qui pourront ensuite être utilisées dans des vaccins de sous-unités. L'invention concerne aussi des vaccins multivalents 10 comprenant un composant de vaccin contre le virus WN et un composant de vaccin contre un autre agent pathogène. L'invention vise principalement les équidés, les canidés, les félidés, les bovidés, les suidés et les oiseaux.

15